

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Biologia Cellulare, Molecolare Industriale; progetto III**

*Ciclo XV*

**Settore Concorsuale di afferenza: 09-D3**

**Settore Scientifico disciplinare: ING-IND/25**

**Produzione di bioidrogeno in dark fermentation da scarti  
dell'industria agroalimentare mediante l'impiego di  
batteri ipertermofili**

**Presentata da: Andrea Alberini**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Alejandro Hochkoeppler**

**Relatore**

**Prof. Davide Pinelli**

*Esame finale anno 2013*

## Sommario

PREFAZIONE.....	6
INTRODUZIONE.....	8
1.1 IL CONSUMO MONDIALE DI ENERGIA PRIMARIA.....	9
IL CARBONE .....	10
IL GAS NATURALE .....	12
IL PETROLIO .....	14
LE RINNOVABILI .....	17
1.2 LA COMUNITÀ EUROPEA E LE DIRETTIVE ENERGETICHE.....	18
LA SITUAZIONE ENERGETICA ITALIANA .....	20
1.3 IL PIANO D'AZIONE NAZIONALE ITALIANO SULLE ENERGIE RINNOVABILI .....	22
1.4 IL PROGETTO BIO-HYDRO .....	23
Sintesi e organizzazione generale del progetto.....	23
LA MACROLINEA IN CUI È STATA SVOLTA L'ATTIVITÀ DI DOTTORATO .....	28
1.5 L'IDROGENO .....	30
CHE COS'È L'IDROGENO E ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE .....	30
LA PRODUZIONE DELL'IDROGENO.....	32
IDROGENO DA FONTI NON RINNOVABILI.....	33
IDROGENO DA FONTI RINNOVABILI .....	35
1.6 LA DARK FERMENTATION .....	41
LA TERMODINAMICA DELLA PRODUZIONE DI IDROGENO NELLA DARK FERMENTATION.....	41
FATTORI CHE INFLUENZANO LA PRODUZIONE D'IDROGENO PER VIA FERMENTATIVA .....	42
L'inoculo .....	42
Il medium di coltura e la configurazione reattoristica.....	43
La pressione parziale di idrogeno .....	44
L'azoto, il fosfato e gli ioni metallici .....	44
La temperatura ed il pH.....	45
TECNICHE PER AUMENTARE LA PRODUZIONE DI IDROGENO PER VIA FERMENTATIVA.....	45
L'ingegneria metabolica .....	45
Sistema ibrido a due stadi .....	47
LE IDROGENASI .....	48
LA PRODUZIONE D'IDROGENO AD ALTE TEMPERATURE .....	50
MICRORGANISMI IDROGENO-PRODUTTORI IPERTERMOFILI.....	51
Thermoanaerobacteriales .....	52
Thermococcales.....	53

1.7 IL GENERE THERMOTOGA .....	54
CARATTERISTICHE METABOLICHE .....	55
PRODUZIONE DI IDROGENO CON IL GENERE THERMOTOGA .....	56
2. MATERIALI E METODI .....	59
2.1 MICRORGANISMI E TERRENI DI COLTURA.....	60
COMPOSTI CHIMICI E SCARTI INDUSTRIALI.....	60
CEPPI DI THERMOTOGA E PREPARAZIONE DELLO STOCK .....	60
SOTTOPRODOTTI TESTATI COME FONTI DI CARBONIO e REAGENTI CHIMICI .....	61
COMPOSIZIONE DEL TERRENO E CRESCITA DELLA COLTURA.....	61
2.2 PROVE CON BIOMASSA SOSPESA.....	65
2.3. SELEZIONE DEL BUFFER .....	65
2.4 SELEZIONE DEI CEPPI DI <i>THERMOTOGA</i> .....	66
2.5 LA MINIMIZZAZIONE DEL MEDIUM DI COLTURA .....	66
2.6 PROVE CON BIOMASSA ADESA.....	68
2.7 SUPPORTI POROSI E TEST DI ADESIONE CELLULARE .....	70
2.8 INIBIZIONE DA OSSIGENO .....	71
2.9 INIBIZIONE DA IDROGENO .....	71
2.10 INIBIZIONE DA SUBSTRATO .....	73
2.11 METODO DI QUANTIFICAZIONE DELLA BIOMASSA .....	75
ANALISI DEL CONTENUTO PROTEICO NELLA BIOMASSA.....	75
QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE IMMOBILIZZATE .....	77
2.12 ANALISI CHIMICHE.....	78
BIOGAS.....	78
ACIDI GRASSI, CARBOIDRATI E RESE .....	80
2.13 ANALISI MOLECOLARI.....	81
ESTRAZIONE DNA GENOMICO .....	81
AMPLIFICAZIONE ED ANALISI DELL' rDNA 16S .....	82
3.8 IL REATTORE SPCSTR.....	83
RISULTATI E CONCLUSIONI .....	89
3.1 INIBIZIONE DA PRODOTTI DI FERMENTAZIONE E SCELTA DEL MIGLIOR BUFFER PER I TEST BATCH....	90
3.2 SELEZIONE DEL pH OTTIMALE PER LA PRODUZIONE DI H <sub>2</sub> DA <i>T. NEAPOLITANA</i> CRESCIUTO SU BIOMAX .....	95
3.3 CORRELAZIONE FRA PESO SECCO E CONTENUTO PROTEICO.....	97
3.4 PRODUZIONE DI IDROGENO CON COLTURE SOSPENSE DI 4 DIVERSI CEPPI DI <i>THERMOTOGA</i> .....	98
3.5 SELEZIONE DEL SUPPORTO PER LA FORMAZIONE DI BIOFILM E LA PRODUZIONE DI IDROGENO .....	103

3.6 PRODUZIONE D'IDROGENO CON COLTURE DI <i>THERMOTOGA</i> A BIOMASSA ADESA CRESCIUTE SU GLUCOSIO, MELASSO E SIERO DI LATTE .....	106
3.7 MINIMIZZAZIONE DEL TERRENO DI COLTURA PER LA PRODUZIONE DI IDROGENO .....	110
Siero di latte.....	111
Melasso.....	114
3.8 INIBIZIONE DA IDROGENO .....	117
3.9 INIBIZIONE DA SUBSTRATO .....	118
GLUCOSIO .....	119
MELASSO .....	121
SIERO DI LATTE .....	123
3.10 PROVE DI SCALE-UP SU REATTORE SPCSTR 19L .....	127
SCELTA DEL VOLUME D'INOCULO .....	128
BATCH TEST CON SIERO DI LATTE.....	129
TEST DI PRODUZIONE IN CONTINUO DI IDROGENO A BIOMASSA ADESA .....	133
CONSIDERAZIONI FINALI.....	137
BIBLIOGRAFIA .....	139
APPENDICE.....	146
Periodo di dottorato all'estero presso il Wageningen UR (NL) .....	146
HyTIME Project .....	147
MATERIALS & METHODS .....	149
Tested Caldicellulosiruptor strains.....	149
Tested Supports.....	150
Inoculum for uBatch test with supports.....	151
CMTB Reactor .....	152
Inoculum for CMTB Reactor .....	153
ANALYTICAL METHODS.....	153
EXPERIMENTAL CONDITIONS .....	154
Attached biomass tests for <i>C. kristijanssonii</i> , <i>C. saccharolyticus</i> , and <i>C. owensensis</i> on supports .....	154
CMTB Reactor co-culture.....	154
RESULTS .....	155
Attached biomass tests for <i>C. kristijanssonii</i> , <i>C. saccharolyticus</i> , and <i>C. owensensis</i> on supports .....	155
CMTB Reactor co-culture.....	159
CONCLUSIONS .....	162



## PREFAZIONE

L'energia è il motore trainante di ogni economia, dalla scala più microscopica a quella più macroscopica, includendo il moto dei pianeti e l'universo intero. Per definizione infatti, in assenza di energia non è possibile svolgere alcun lavoro. Che sia quindi di natura chimica, meccanica, elettrica, elettromagnetica, luminosa, termica o nucleare l'energia risulta quindi essenziale allo sviluppo della nostra specie e al proseguimento della nostra evoluzione tecnico scientifica così come al mantenimento delle buone condizioni di vita che lo stesso avanzamento tecnologico ha consentito di raggiungere ai paesi più sviluppati. Tutti gli abitanti della terra aspirano ad un maggior benessere, e l'energia è il mezzo necessario a raggiungere tale obiettivo.

Dalla fine del 1800 ad oggi l'economia energetica del nostro Pianeta si è basata primariamente sull'estrazione e raffinazione del greggio presente sotto la crosta terrestre. Il petrolio, che dall'etimologia significa "Olio di roccia", è un liquido infiammabile, denso, di un colore che può andare dal nero al marrone scuro e non è nient'altro che un fossile liquido, o meglio un insieme di numerosissimi fossili vegetali che con il trascorrere delle ere geologiche e sottoposti a particolari condizioni di temperatura e pressione si sono modificati fino a raggiungere la configurazione del petrolio che ben tutti conosciamo.

Grazie appunto ad alcune delle sue caratteristiche chimico/fisiche il petrolio è quindi stato scelto come candidato ideale al sostenimento dello sviluppo del genere umano, l'unico al mondo capace di attingere e di sfruttare le preziose scorte. Sfortunatamente però l'utilizzo del petrolio e dei suoi derivati (polimeri plastici e fertilizzanti chimici sono solo due dei tanti esempi) non ha avuto come unica conseguenza una cascata di eventi positivi ma anzi, ha creato e continua a creare numerosi problemi ambientali dovuti al suo sempre più sfrenato utilizzo, comandato dalle crescenti necessità energetiche dei paesi sviluppati così come dei 5 Paesi del BRICS (Brasile, Russia, India, Cile e Sudafrica) che rappresentano da soli quasi la metà della popolazione mondiale e il 28 % dell'attuale economia globale. Vale la pena di ricordare che il petrolio è solamente una delle fonti energetiche non rinnovabili utilizzate assieme al gas naturale e al carbone.

Nel XVII secolo è così iniziata la più grande catastrofe ecologica di sempre. L'utilizzo del carbone prima e del petrolio poi ha determinato un rapido peggioramento dei livelli di inquinamento di aria, acqua e suolo. Serve una quanto più rapida inversione di rotta senza la quale le condizioni di salute del Pianeta continueranno a peggiorare. Le previsioni future sono drammatiche: aumento del tasso tumorale, riscaldamento globale, riduzione delle scorte idriche utilizzabili, riduzione della biodiversità.

L'Uomo, a distanza di quasi due secoli dall'inizio di un uso intensivo del petrolio, si trova nella situazione di dover rimediare prontamente a questa condizione e di interrompere quindi lo scempio che il suo stesso "genio" ha generato. Indirizzare le nostre conoscenze e le nostre forze al fine di trovare una strada

alternativa, ecologica e sostenibile, capace di darci l'energia di cui necessitiamo è il più fondamentale passo per un reale sviluppo, per la prima volta a braccetto con il nostro unico e meraviglioso pianeta Terra.

Nei primi capitoli della presente tesi di Dottorato mi accingerò a descrivere brevemente la situazione energetica Mondiale ed Italiana, descriverò poi che cos'è l'idrogeno e quali sono i metodi attualmente conosciuti per la sua produzione. Successivamente passerò ad una descrizione d'insieme del Progetto BioHydro, finanziato dal MIPAAF negli anni 2010, '11 e '12, sviluppando in maniera più puntale e presentando i risultati ottenuti dai work packages sui quali il sottoscritto ha lavorato personalmente presso l'Università di Bologna, Dipartimento di Ingegneria Civile Chimica, Ambientale e dei Materiali – DICAM, iniziando di fatto la ricerca nel campo della produzione biologica di idrogeno molecolare per via fermentativa all'interno dell'Università di Bologna.

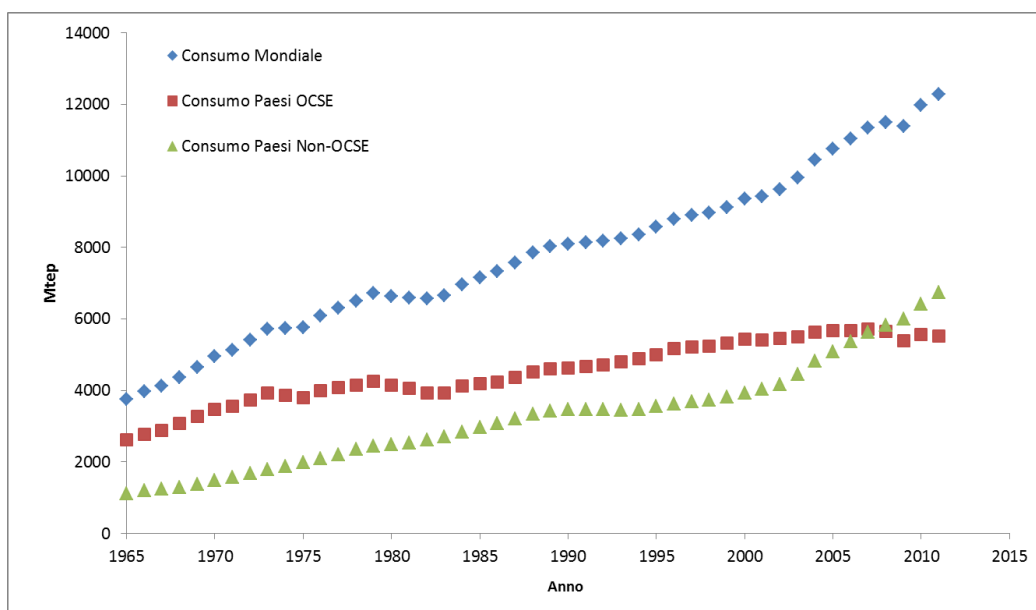
## INTRODUZIONE



## 1.1 IL CONSUMO MONDIALE DI ENERGIA PRIMARIA

Nel presente capito saranno mostrati gli andamenti dei consumi di energia primaria. Successivamente saranno affrontati singolarmente le principali fonti di energia attuali e quindi combustibili fossili (carbone, gas naturale e petrolio) e i loro prezzi in Europa, con qualche nota a riguardo delle previsioni più recenti in merito alle loro disponibilità. La fonte utilizzata per i dati dei consumi energetici è unica ed è il *British Petrol Statistical Review of World Energy 2012 June 2012* ([bp.com/statisticalreview](http://bp.com/statisticalreview)).

Il mercato energetico è descrivibile come un Uroboro, cioè un serpente che si morde la coda. La crescita e lo sviluppo delle società richiedono una sempre maggiore quantità di energia disponibile e di facile accesso, tale disponibilità spinge a sua volta verso l'innovazione e la crescita. Andiamo quindi a vedere i dati del *BP Statistical Review of World Energy 2012 June 2012* in merito al consumo globale di energia per osservarne il trend e considerare ciò che avviene sulla scala mondiale (Grafico 1.1).



**Figura 1.1: Consumo di energia in Mtep dal 1965 al 2011**

È facile osservare come il trend mondiale di crescita sui consumi di energia primaria sia in costante crescita, ma ancora una volta è interessante considerare come questa si suddivide fra paesi OCSE e Non-OCSE. Dall'anno 2000 in avanti i paesi occidentali considerabili "sviluppati" evidenziano un ridottissima crescita della loro richiesta energetica mentre i paesi in via di sviluppo hanno iniziato ad aumentare la loro brama. Questo è insito nella definizione stessa di paesi in via di sviluppo ed è un tren che non è possibile invertire. È importante far presente che i dati in grafico tengono conto di tutte le tipologie di fonti energetiche, incluso le rinnovabili che, seppur ricoprono un ruolo oggi marginale rispetto ai quantitativi totali sono comunque in forte crescita.

Fra il 2010 e il 2011 il consumo di energia primaria è cresciuto del 2.5%, valore circa in linea con la media registrata negli ultimi 10 anni. A supporto di quanto accennato in precedenza i paesi

OCSE registrano un calo dei consumi dello 0.8% rispetto al 2010 mentre i Non-OCSE una crescita del 5.3%.

## IL CARBONE

Secondo i dati della British Petrol (BP) il consumo di carbone (Grafico 1.2) espresso in milioni tonnellate equivalenti di petrolio (Mtep) da parte dei paesi dell'OCSE è rimasto pressochè invariato dal 1965 al 2011, mentre si è registrato un rapido aumento dei consumi da parte dei paesi non OCSE con un tasso di crescita elevatissimo dal 2003, dato compatibile con l'incremento di produzione del carbone da parte degli stessi paesi non OCSE (Grafico 1.3). Al 2011 infatti i paesi non OCSE coprono il 70.5% dei consumi totali mentre i paesi OCSE il 29.5%. Considerando la variazione dal 2010 al 2011 si è registrato un aumento globale dei consumi pari al 5.4%. Questo lo rende il combustibile fossile che registra la crescita maggiore nel 2011. Il carbone rappresenta così il 30,3% del consumo globale di energia, la quota più alta dal 1969. Il consumo al di fuori dell'OCSE è aumentato dell' 8,4%, guidato da consumo cinese del 9,7% in continuo aumento. Al contrario invece il consumo da parte dei paesi OCSE è diminuito di un 1,1% con perdite negli Stati Uniti e in Giappone compensate però da una crescita dei consumi in Europa. Nel 2011 la produzione mondiale annua di carbone è cresciuta complessivamente del 6,1% rispetto all'anno precedente.

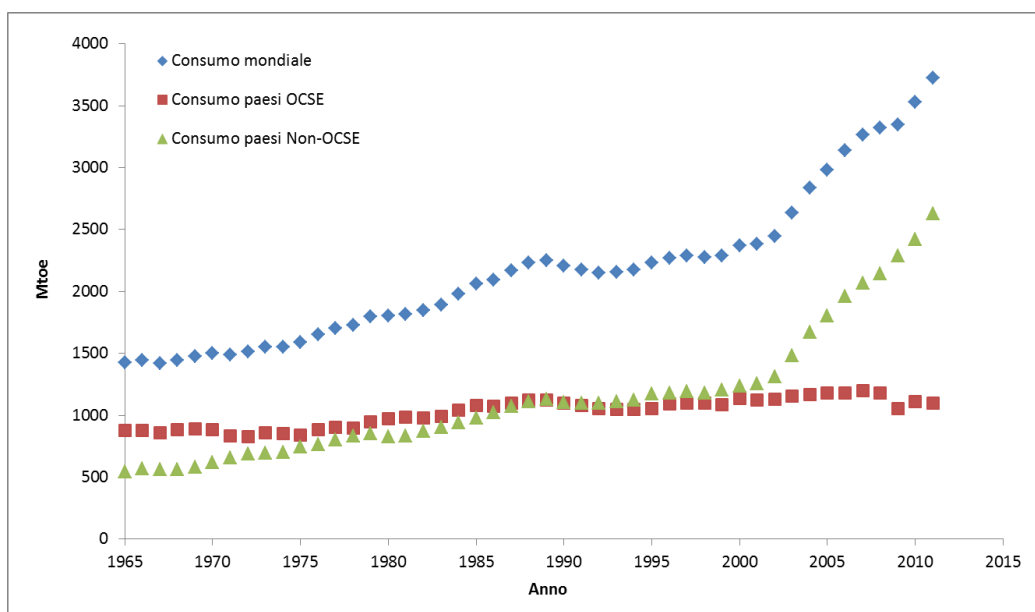
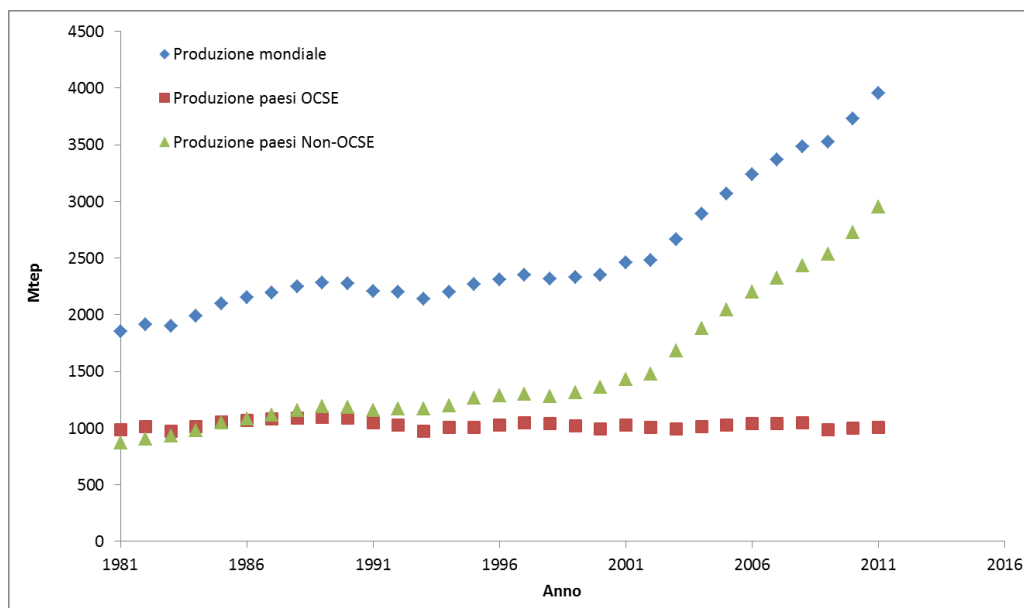


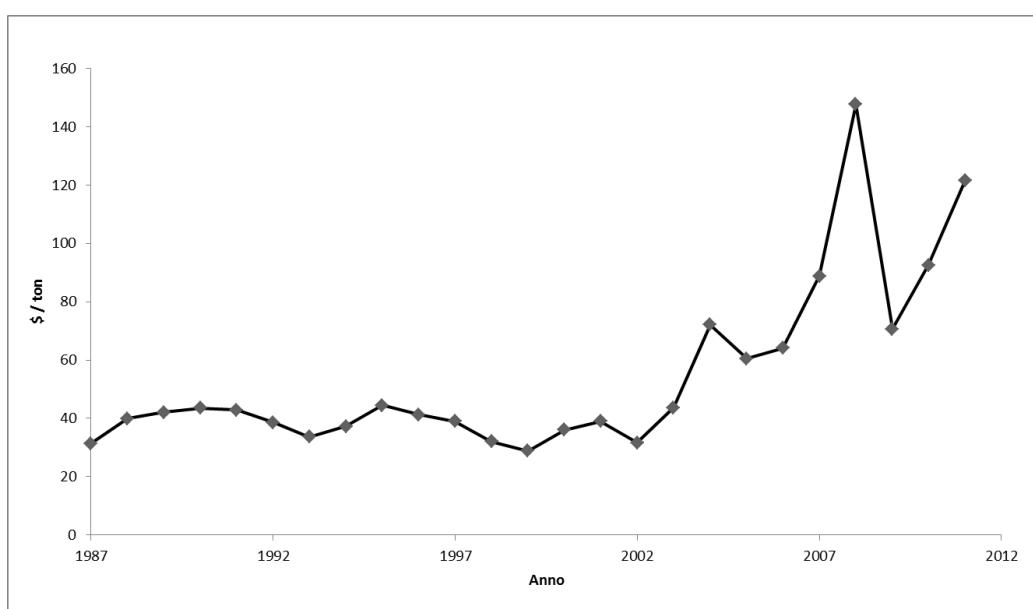
Figura 1.2: Consumo mondiale di carbone espresso in Mtep



**Figura 1.3: Produzione di carbone a livello mondiale espresso in Mtep**

Al ritmo attuale di consumo, (e in assenza di nuove scoperte o della messa in esercizio dei giacimenti attualmente non sfruttati in quanto troppo costosi) le riserve provate di carbone dureranno per circa altri 111 anni.

Il prezzo del carbone è strettamente correlato al prezzo al barile di petrolio. Questo perchè il trasporto del carbone è un'importante voce di spesa. Il Grafico 3 mostra l'andamento del prezzo del carbone in Europa negli ultimi 24 anni.

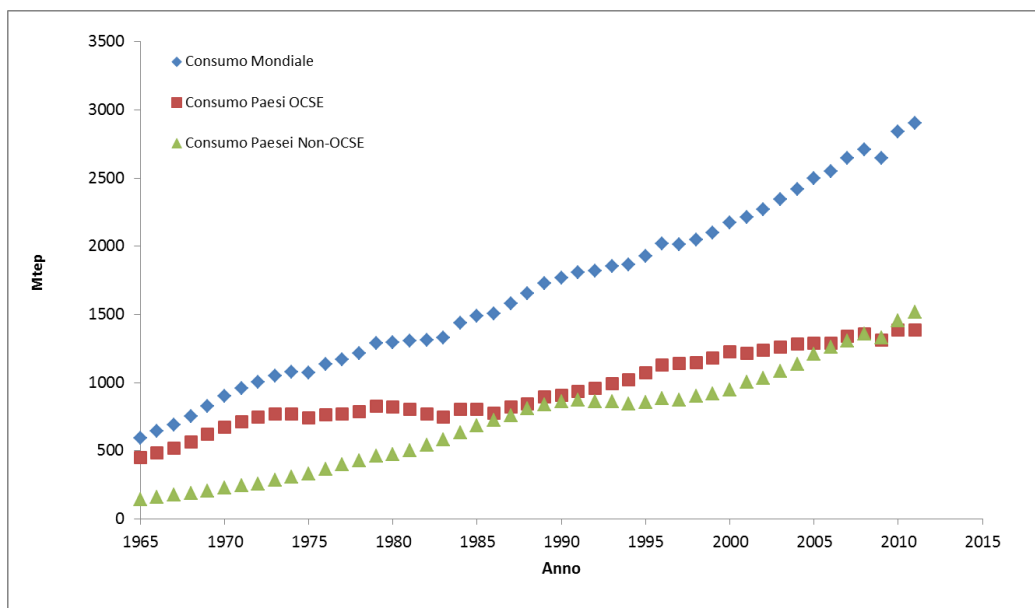


**Figura 1.4: Andamento del prezzo del carbone in \$/tonnellata**

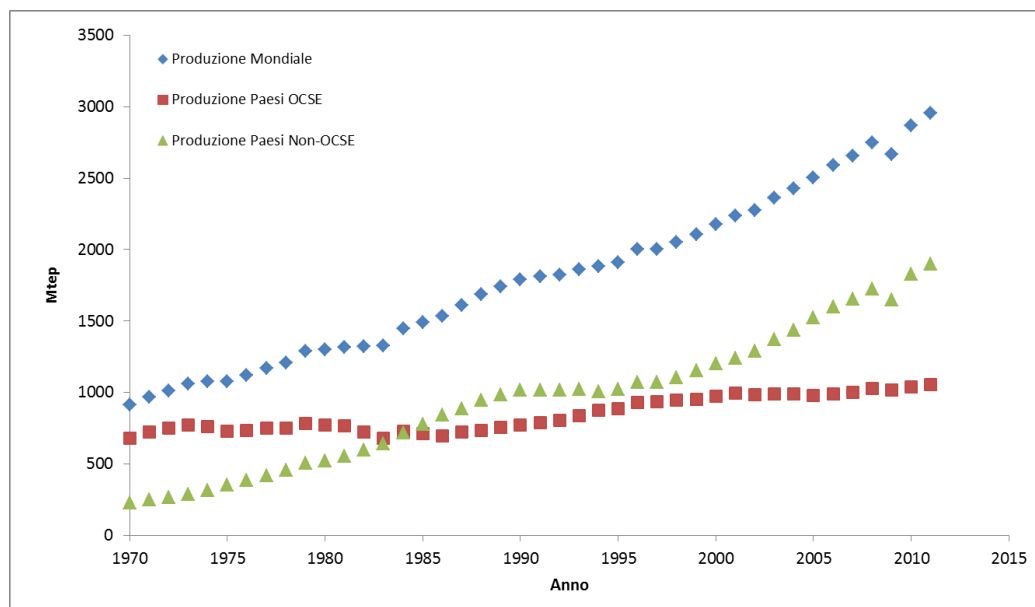
## IL GAS NATURALE

Il consumo di gas naturale del mondo (Grafico 1.5) è cresciuto del 2,2% tra il 2010 e il 2011. La crescita dei consumi è stata inferiore alla media in tutte le regioni mondiali ad eccezione del Nord America, dove i prezzi bassi hanno guidato una robusta crescita. Al di fuori del Nord America, i più grandi incrementi volumetrici di consumo sono stati in Cina (+21,5%), Arabia Saudita (+13,2%) e il Giappone (+11,6%). A livello globale questi aumenti sono stati parzialmente compensati dal più grande calo mai registrato nel consumo di gas dell'Unione europea (-9,9%), guidato da una economia debole, i prezzi elevati del gas, un clima caldo e la continua crescita nella produzione di energia rinnovabile. La produzione globale di gas naturale (Fig. 1.6) è cresciuta del 3,1%. Gli Stati Uniti (+7,7%) ha registrato il maggior incremento volumetrico, nonostante i prezzi del gas, ed è rimasto il più grande produttore al mondo. Uscita anche crebbe rapidamente in Qatar (+25,8%), Russia (+3,1%) e Turkmenistan (+40,6%), più di cali di segno opposto in Libia (-75,6%) e il Regno Unito (-20,8%). Come è avvenuto per il consumo, l'UE ha registrato anche il maggior calo della produzione di gas in archivio (-11,4%), a causa di una combinazione di settore ormai maturo, la manutenzione e un debole consumo regionale. In seguito alla debolezza generale dei consumi di gas naturale, gli scambi mondiali di gas sono aumentati di un modesto 4% nel 2011. Le consegne di Gas Naturale Liquido (GNL) sono cresciute del 10,1%, con il Qatar (+34,8%) che rappresenta la quasi totalità (87,7%) dell'aumento. Tra gli importatori di GNL, la crescita più grande è stata in Giappone e nel Regno Unito. Il GNL rappresenta oggi il 32,3% del commercio mondiale del gas. Per quanto riguarda le consegne di gas naturale attraverso gasdotti si sono registrati aumenti solo di un 1,3%, con cali delle importazioni da Germania, Regno Unito, Stati Uniti e Italia compensate da aumenti di importazioni in Cina (dal Turkmenistan), Ucraina (dalla Russia), e la Turchia (da Russia e Iran).

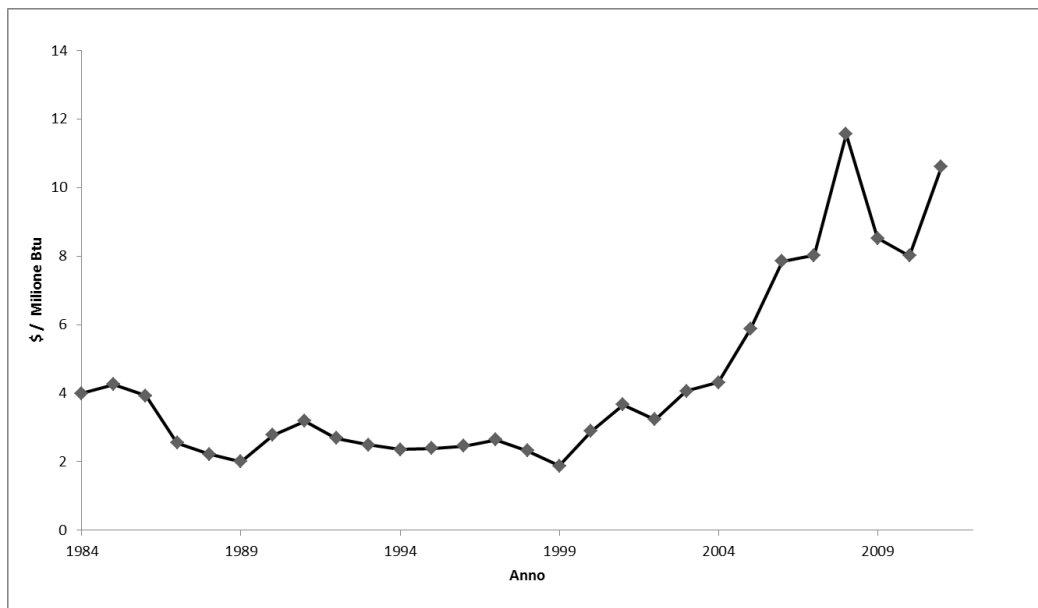
In base agli attuali consumi (e in assenza di nuove scoperte o della messa in esercizio dei giacimenti attualmente non sfruttati in quanto troppo costosi) le riserve di gas naturale dureranno 59 anni.



**Figura 1.5: Consumi di gas naturale**



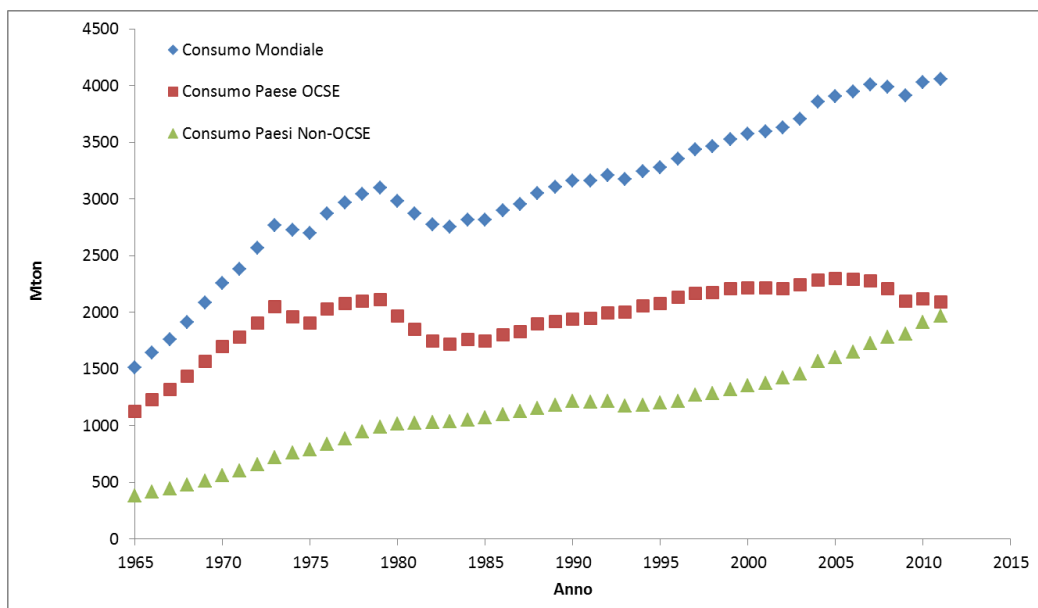
**Figura 1.6: produzione gas naturale**



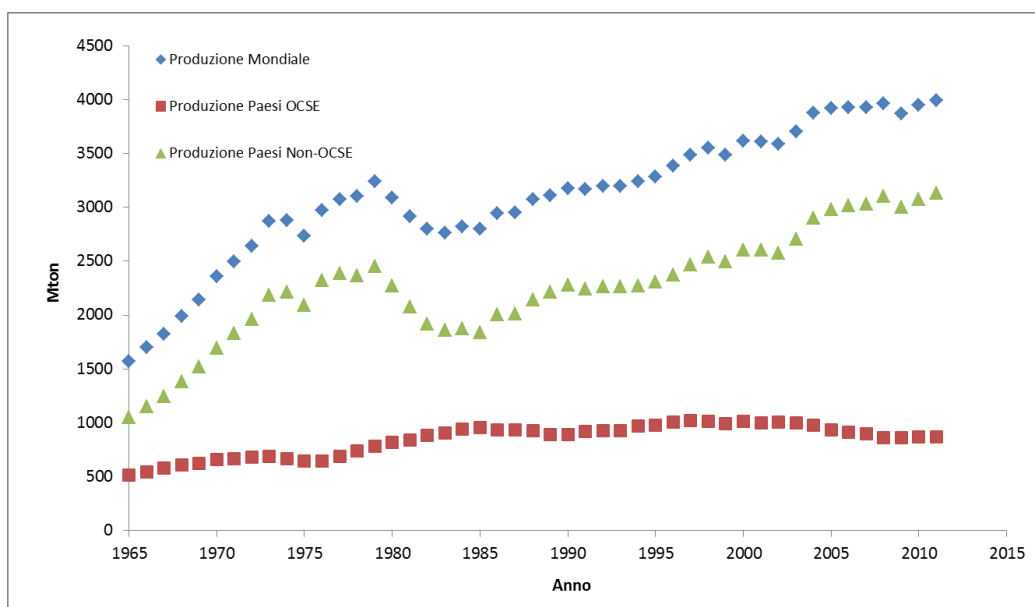
**Figura 1.7: prezzo del gas naturale**

## IL PETROLIO

Arriviamo ora a considerare il comportamento del petrolio sia per quanto riguarda la produzione (Grafico 1.8), i consumi (Grafico 1.9) e il prezzo al barile (Grafico 1.10). Secondo il report di BP il consumo mondiale di petrolio dal 1983 al 2011 è aumentato seguendo un trend costante malgrado i paesi OCSE, dal 2005 al 2011 stiano lentamente riducendo i consumi. Di contro infatti e con grande fermento i paesi non-OCSE, capitanati dai paesi BRICS, stanno aumentando le loro richieste di petrolio. Nell'ultimo anno preso in analisi il consumo globale di petrolio è così cresciuto di un timido 0,7%, il più debole tasso di crescita fra i tre combustibili fossili. Il consumo da parte dei paesi OCSE è diminuito di un 1.2 % mentre fuori OCSE il consumo ha avuto una crescita del 2.8% nonostante la forte ascesa dei prezzi. Nonostante il prezzo competitivo, la crescita dei consumi di petrolio nei paesi produttori del Medio Oriente e in alcune regioni dell'Africa (Primavera Araba) era inferiore alla media nelle regioni produttrici e questo a causa dei disordini a cui quelle zone sono state soggette. La Cina ha registrato ancora una volta la più grande crescita dei consumi globali con un +5,5%, anche se il tasso di crescita è stata inferiore alla media degli ultimi 10 anni.

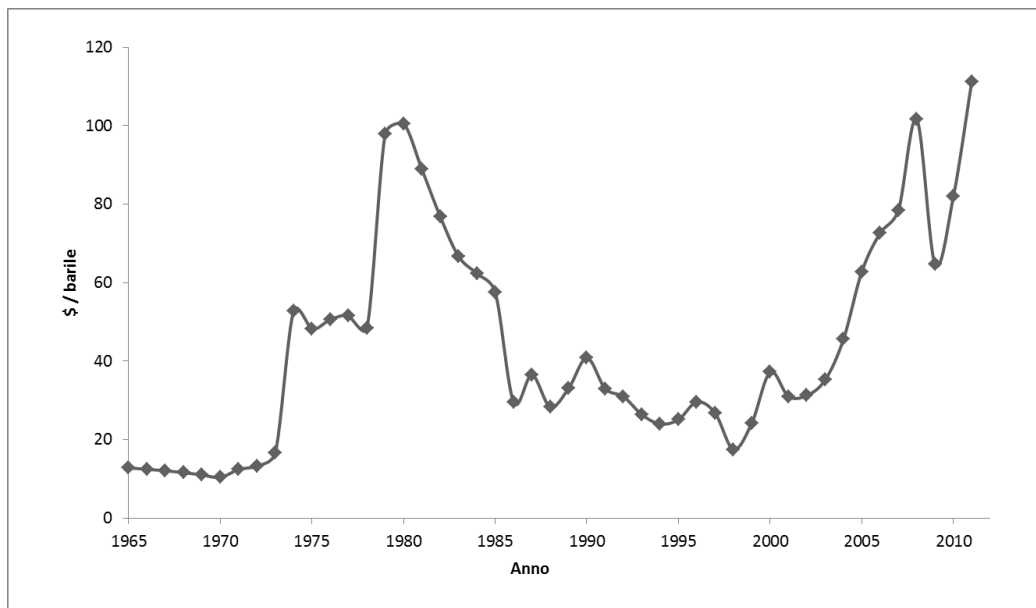


**Figura 1.8: Consumo mondiale di petrolio**



**Figura 1.9: Produzione mondiale di petrolio**

Va osservato come il prezzo del petrolio sia fortemente soggetto a variazioni legate a momenti storici a cui corrispondono fasi di espansione economica o di crisi. Negli anni '70 ci furono infatti 2 crisi che portarono i prezzi del petrolio a quotazioni mai raggiunte prima, così come durante la crisi del 2008 il valore al barile del petrolio greggio è giunto al massimo storico. Anche ora il trend del prezzo al barile, malgrado possibili fluttuazioni, è in netta crescita.



**Figura 1.10: Andamento del prezzo del petrolio \$/barile**

Non si sa precisamente quando si raggiungerà il nuovo picco, non si sa neppure quando finirà il petrolio, si sa però che i costi di estrazione aumenteranno senza tregua in quanto i giacimenti a cui si attinge saranno sempre a profondità maggiori sotto la crosta terrestre e lontano dalle coste (il cosiddetto petrolio offshore). Tali mastodontici interventi da parte delle compagnie petrolifere richiedono enormi investimenti economici proprio per le grandi sfide tecnologiche che essi rappresentano. Non vanno però scordati i grandi rischi ecologici che queste piattaforme hanno dimostrato di avere, esempio eclatante e di recente avvenimento il disastro ecologico provocato dalla piattaforma petrolifera Deepwater Horizon (controllata dalla BP) nel Golfo del Messico. L'incidente, iniziato il 20 aprile 2010 in cui hanno perso la vita alcuni operatori della piattaforma, è stato riparato dopo 106 giorni e ha sversato in mare un totale di c.ca 100.000 tonnellate di greggio. Tale evento ha preso il nome di "marea nera". Il danno ecologico è incalcolabile, tutto l'ecosistema marino è stato fortemente colpito e deturpato.

Nonostante l'incidente, e il rischio corso, le operazioni di trivellazione nelle profondità marine e dei ghiacci polari non si fermano. Troppo importanti gli investimenti effettuati dai colossi del petrolio, troppo poco le voci di chi avanza dubbi e paure per le popolazioni e l'ambiente.



## LE RINNOVABILI

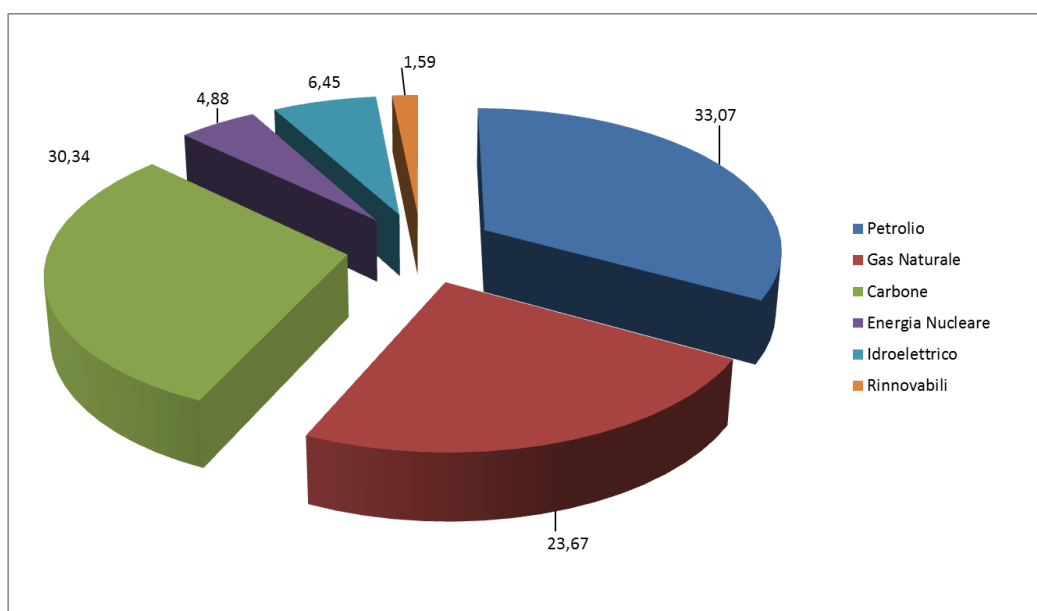
Non esistono solo carbone, gas naturale e petrolio ma fortunatamente, grazie alla presa visione della situazione ecologica mondiale, ai prezzi sempre crescenti delle fonti non rinnovabili, alla loro sempre maggiore scarsità e a seguito quindi di particolari accordi energetici internazionali, la comunità sta ponendo sempre maggiore attenzione nei riguardi delle fonti di energia rinnovabile.

Con il termine energia rinnovabile s'identifica *"una qualsiasi fonte energetica che si rigenera almeno alla stessa velocità con cui si utilizza"*. In accordo con l'International Energy Agency (IEA) - rientrano in questa categoria:

- energia solare
- energia eolica
- energia geotermica
- energia da biomassa
- energia idroelettrica

Possiamo quindi indicare come Fonti Rinnovabili di Energia (F.E.R.) tutte quelle che si contrappongono alle energie tradizionali di origine fossile sia per il loro potenziale inesauribile sia perché esse hanno un minore impatto ambientale. Con l'impegno delle F.E.R. è possibile limitare le emissioni di CO<sub>2</sub> come richiesto dal Protocollo di Kyoto, inoltre le nuove tecnologie in via di sviluppo permettono di ottenere energia rinnovabile per il futuro ad un prezzo competitivo risolvendo così il grosso problema della sempre più crescente richiesta di energia. Un altro punto di forza delle F.E.R. è che per la maggior parte sono risorse locali e ciò determina un minore spreco energetico per il loro trasporto e al contempo una valorizzazione del territorio con ricadute positive sull'economia. Per tutti questi aspetti le F.E.R. vengono considerati alla base della cosiddetta "Economia Verde".

Nonostante l'elevato tasso di crescita l'energia rinnovabile continua a rappresentare solamente una piccola frazione, pari al 1.59% dell'attuale consumo globale di energia (Grafico 1.11). La produzione di elettricità da F.E.R. viene stimata ad un 3.9% della produzione totale di elettricità. Le rinnovabili comunque hanno iniziato a giocare un ruolo rilevante nei riguardi della crescita dell'elettricità, contribuendo al 20% della crescita globale di energia prodotta nel 2011. La rapida crescita della produzione energetica da F.E.R. è continuata anche nel 2011 con un +17.7% rispetto all'anno precedente (solo di uno 0.1% in meno rispetto alla crescita fra il 2009 e il 2010). Tradizionalmente l'Europa e il Giappone sono i leader nello sviluppo delle tecnologie a base di F.E.R., anche grazie agli incentivi governativi a tali fonti di energia, ma oggi anche gli U.S. e la Cina si sono unite alla sfida investendo capitali per sostenere lo sviluppo.



**Figura 1.11: Paniere del consumo energetico mondiale di energia di diversa origine: fine 2011**

É innegabile come l'impegno che va posto nello sviluppo di nuove tecnologie atte ad aumentare lo sfruttamento delle F.E.R. deve crescere di anno in anno. Con i tassi di crescita attuali, infatti, e malgrado gli sforzi finora profusi, i risultati non sono tali da far sperare in un futuro svincolato dai combustibili fossili. Secondo il rapporto dell'IEA, il *World Energy Outlook 2011*, con le tendenze attuali il riscaldamento globale potrebbe raggiungere il 3.5°C e quindi non sarebbe possibile mantenere ciò che è stato sancito durante gli accordi ONU (Copenaghen 2009 e Cancún 2010) che prevedeva di mantenere il valore al di sotto dei 2°C. Alla luce dei fatti attuali non s'intuisce una svolta nelle tendenze energetiche mondiali e probabilmente il Pianeta resterà bloccato in questo inefficiente sistema energetico, altamente inquinante, fino alla fine della prima metà del secolo in corso.

## 1.2 LA COMUNITÀ EUROPEA E LE DIRETTIVE ENERGETICHE

Al tempo della nascita della Comunità Europea dei trattati di Roma del 1957, il discorso energia non venne preso in considerazione come invece fu per l'agricoltura e per tecnologie particolari quali il carbone. Va quindi considerato che gli interventi della poi Unione europea sui temi energetici hanno una genesi alquanto complessa. Le scelte energetiche e la fiscalità energetica sono state da sempre diverse per ogni paese comunitario, applicando ognuno le proprie regole nazionali su tali materie; l'UE ha iniziato a far entrare l'energia tra le sue competenze attraverso le porte dell'ambiente, della competitività, della coesione sociale, della garanzia delle forniture, della ricerca scientifica e del commercio transfrontaliero.

Sulla base delle esperienze e delle evoluzioni delle politiche energetiche che hanno visto un crescente integrarsi delle decisioni ambientali con quelle energetiche, l'Unione ha definito una

strategia di riduzione autonoma delle emissioni climalteranti del 20% entro il 2020, formalizzata più tardi nella direttiva 2009/28/CE del 5 giugno 2009 , con specifici indirizzi relativi alle fonti rinnovabili.

La strategia dell'Unione si prefigge tre diversi principali obiettivi: la riduzione dell'entità dei consumi globali di fonti energetiche, la riduzione delle emissioni di gas capaci di alterare il clima e infine l'aumento della presenza di fonti rinnovabili nel totale delle fonti utilizzate.

Nel periodo 2001-2008 si sono succedute varie azioni preparatorie e di previsione, con la partecipazione di vari attori che hanno contribuito alla definizione di una strategia condivisa.

Le principali direttive sono:

- 2001/77/CE sullo sviluppo delle fonti rinnovabili elettriche con obiettivi senza sanzione
- 2004/8/CE sulla promozione della cogenerazione
- 2005/32/CE sulla progettazione ecocompatibile dei prodotti che consumano energia
- 2006/32/CE sull'efficienza degli usi finali dell'energia e i servizi energetici
- 2008/98/CE relativa ai rifiuti
- 2009/29/CE (a modifica della 2003/87/CE) al fine di perfezionare ed estendere il sistema comunitario sullo scambio di quote di emissione di gas a effetto serra

Nel corso della sua storia la Comunità Europea ha quindi avvertito la necessità di soddisfare criteri ambientali atti a garantire un suo sviluppo sostenibile. A tal fine, la 2009/28/CE (Cit. Art. 1) *“..stabilisce un quadro comune per la promozione dell'energia da fonti rinnovabili. Fissa obiettivi nazionali obbligatori per la quota complessiva di energia da fonti rinnovabili sul consumo finale lordo di energia e per la quota di energia da fonti rinnovabili nei trasporti. Detta norme relative ai trasferimenti statistici tra gli Stati membri, ai progetti comuni tra gli Stati membri e con i paesi terzi, alle garanzie di origine, alle procedure amministrative, all'informazione e alla formazione nonché all'accesso alla rete elettrica per l'energia da fonti rinnovabili. Fissa criteri di sostenibilità per i biocarburanti e i bioliquidi.”*

Essenzialmente il controllo del consumo di energia europeo e il maggiore ricorso all'energia da fonti rinnovabili, congiuntamente ai risparmi energetici e a un aumento dell'efficienza energetica, costituiscono parti importanti del pacchetto di misure necessarie per ridurre le emissioni di gas a effetto serra e per rispettare il protocollo di Kyoto della convenzione quadro delle Nazioni Unite sui cambiamenti climatici e gli ulteriori impegni assunti a livello comunitario e internazionale per la riduzione delle emissioni di gas a effetto serra oltre il 2012. Tali fattori hanno un'importante funzione anche nel promuovere la sicurezza degli approvvigionamenti energetici, nel favorire lo sviluppo tecnologico e l'innovazione e nel creare posti di lavoro e sviluppo regionale, specialmente nelle zone rurali ed isolate.

Facendo riferimento alla scadenza del 2020 la strategia europea si esprime con tre obiettivi:

- consumi di fonti primarie ridotti del 20% rispetto alle previsioni tendenziali, mediante aumento dell'efficienza secondo le indicazioni di una futura direttiva,

- emissioni di gas climalteranti, ridotte del 20%, secondo impegni già presi in precedenza, protocollo di Kyoto, ETS (Emissione Trading Scheme),
- aumento al 20% della quota di fonti rinnovabili nella copertura dei consumi finali (usi elettrici, termici e per il trasporto)

Al fine di raggiungere tali obiettivi la UE ha dovuto affrontare un passaggio delicatissimo che è stato quello della ripartizione dell'obiettivo comune fra i vari stati. Considerando quindi le diverse situazioni Nazionali e per non gravare quindi sui paesi entrati da poco nell'Unione, già impegnati con diversi problemi di adeguamento dei loro sistemi economici e normativi, non si è utilizzato né il criterio delle potenzialità né il criterio di ottimizzazione economica delle risorse per la realizzazione degli interventi. Il criterio scelto è stato quello di stimare il livello degli usi finali previsto nel 2020 ed elaborare una valutazione del contributo fornito dalle fonti rinnovabili nel 2005. L'obiettivo da raggiungere è stato diviso in due parti, una uguale per ogni paese e la seconda legata alla popolazione e al PIL di ogni nazione; per l'Italia è risultato un obiettivo del 17%, ripartito a sua volta, fra le Regioni. Questa suddivisione, detta "burden sharing" sarà un passaggio obbligato per il raggiungimento dell'obiettivo nazionale.

Secondo la 2009/28/CE ogni stato membro ha infatti il dovere di produrre un Piano d'Azione Nazionale (PAN) per le energie rinnovabili (Cit.Art. 4): *"I piani di azione nazionali per le energie rinnovabili fissano gli obiettivi nazionali degli Stati membri per la quota di energia da fonti rinnovabili consumata nel settore dei trasporti, dell'elettricità e del riscaldamento e raffreddamento nel 2020, tenendo conto degli effetti di altre misure politiche relative all'efficienza energetica sul consumo finale di energia, e le misure appropriate da adottare per raggiungere detti obiettivi nazionali generali, ivi compresi la cooperazione tra autorità locali, regionali e nazionali, i trasferimenti statistici o i progetti comuni pianificati, le politiche nazionali per lo sviluppo delle risorse della biomassa esistenti e per lo sfruttamento di nuove risorse della biomassa per usi diversi."*

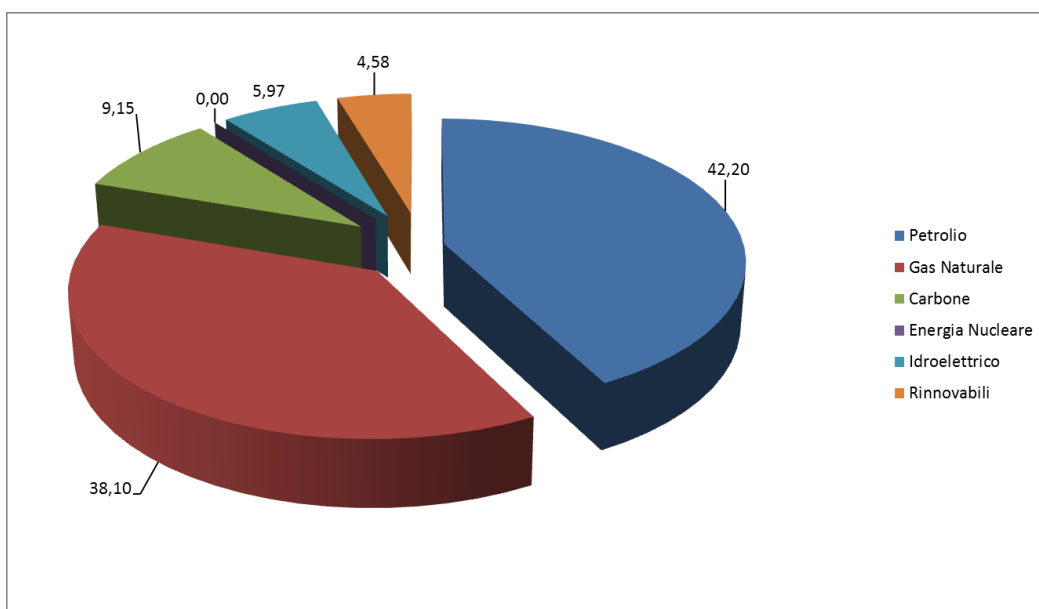
Agli stati membri viene chiesto di preparare un Piano Nazionale di Azione (PAN) entro il 30 giugno 2010 e ovviamente anche l'Italia ha redatto il suo Piano d'Azione Nazionale sulle rinnovabili. Prima di analizzare tale documento è opportuno soffermarsi sull'attuale situazione energetica Italiana.

## LA SITUAZIONE ENERGETICA ITALIANA

L'andamento del consumo energetico del Bel Paese rispecchia fundamentalmente ciò che abbiamo già osservato considerando i paesi dell'OCSE. Stando ai dati della BP infatti si nota che fino al 2005 il consumo di energia aumentò sino al valore massimo di 185.1 Mtep (Grafico ..). Negli anni successivi invece si è osservata un'inversione del trend e il consumo di energia primaria nel 2011 si è attestato sui 168.5 Mtep. Da notare inoltre come i consumi energetici si siano ridotti fortemente nel 2009 in corrispondenza della fase più acuta della crisi economica internazionale iniziata negli Stati Uniti nel 2007 e che ha colpito le potenze industrializzate del mondo dall'ottobre 2008. La successiva crescita registrata nel 2010 è stata attribuita alle politiche anti-

crisi adottate ma il loro risultato è durato ben poco poiché già nel 2011 abbiamo assistito a una nuova contrazione del mercato energetico Nazionale dovuta ad ulteriori ripercussioni della crisi economica attualmente in corso.

Analizzando i consumi di energia primaria Italiani e suddividendoli per tipologia di fonte possiamo notare che il nostro Paese ha scelto, da qualche anno a questa parte, di avvantaggiare l'utilizzo del gas naturale come fonte energetica principale a discapito del petrolio; sia nel settore civile sia nel settore della generazione elettrica. Dai dati reperibili presso il Ministero dello Sviluppo Economico, che annualmente redige il Bilancio Energetico Nazionale (BEN), si osserva come i consumi di gas naturale siano aumentati del 22% dal 2002 al 2005 con un picco di 71.2 Mtep nel 2005 mentre, in seguito a quell'anno, e soprattutto in concomitanza con la crisi finanziaria, si è registrata una contrazione dei consumi, seppur ridotta rispetto a quanto è accaduto ai consumi di petrolio. D'altro canto la crisi finanziaria ha portato a evidenziare un settore di energia primaria che, nonostante il periodo poco proficuo da punto di vista economico, non ha subito effetti inibitori ma anzi ha visto un andamento crescente, le energie rinnovabili. Queste ultime, pur continuando a ricoprire un'esigua frazione del paniere energetico Italiano (Grafico 1.12), sono cresciute del 73% negli ultimi dieci anni (fonte BEN). I combustibili fossili dominano tutti i settori economici e, in particolare, si osserva la netta predominanza del petrolio nel settore dei trasporti e del gas naturale in quello civile. Le rinnovabili sono impiegate principalmente nel settore civile e dei trasporti e in minima parte nell'industria e nell'agricoltura. Come già detto, il loro contributo rimane comunque marginale rispetto a quello dei combustibili fossili che sono impiegati quasi esclusivamente nell'industria.



**Figura 1.1: Paniere del consumo energetico Italiano a fine 2011**

## **1.3 IL PIANO D'AZIONE NAZIONALE ITALIANO SULLE ENERGIE RINNOVABILI**

Il PAN, trasmesso alla Commissione Europea con il leggero ritardo caratteristico dell'Italia il 28 luglio 2010, illustra la strategia nello sviluppo delle fonti energetiche rinnovabili e disegna le principali linee d'azione per ciascun'area d'intervento (Elettricità, Riscaldamento - Raffreddamento e Trasporti) sul consumo energetico lordo complessivo. In esso sono racchiuse le misure economiche necessarie per raggiungere gli obiettivi.

E' prevista nel Piano l'adozione di ulteriori misure trasversali quali lo snellimento dei procedimenti autorizzativi, lo sviluppo delle reti di trasmissione e distribuzione per un utilizzo intensivo/intelligente del potenziale rinnovabile, le specifiche tecniche di apparecchiature e impianti e la certificazione degli installatori. Il Piano considera, tra l'altro, sia l'introduzione di criteri di sostenibilità da applicare alla produzione di biocarburanti e bioliquidi, sulla base di sistemi di tracciabilità, sull'intera filiera produttiva, sia misure di cooperazione internazionale.

Il 28 marzo 2011 è stato pubblicato in Gazzetta Ufficiale il decreto legislativo n.28 del 03/03/2011 per il recepimento della Direttiva 2009/28/CE sullo sviluppo delle fonti rinnovabili.

Gli obiettivi nazionali fissati sono:

- La quota complessiva di energia da fonti rinnovabili sul consumo finale lordo di energia da conseguire nel 2020 è pari a 17%.
- Nell'ambito dell'obiettivo del 17% al 2020, la quota di energia da fonti rinnovabili in tutte le forme di trasporto dovrà essere nel 2020 pari almeno al 10 per cento del consumo finale di energia nel settore dei trasporti nel medesimo anno.

Va da sé che a seguito della pubblicazione del DL n°28 del 03/03/2011 l'Italia è obbligata a raggiungere gli obiettivi prefissati dalla direttiva europea e per far ciò dovrà incentivare lo sviluppo del mercato delle energie alternative promuovendo, fra l'altro, progetti di ricerca volti a creare l'innovazione tecnologica necessaria al nostro Paese.

Le necessità Europee in merito alle fonti di energia alternativa hanno gradualmente innescato una cascata di conseguenze che si sono manifestate, fra le altre, anche sul Piano Nazionale della Ricerca (PNR) e hanno creato le circostanze adatte alla presentazione di progetti di ricerca inerenti allo sviluppo di tecnologie energetiche su territorio nazionale. Il PNR è infatti il documento programmatico del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR), contenente il quadro della situazione del settore della ricerca scientifica e tecnologica italiana, nonché gli indirizzi e le proposte date dal Governo. Il PNR fornisce le indicazioni di priorità delle Regioni, delle Amministrazioni dello Stato e delle parti sociali e riporta un'analisi di alcuni settori strategici di carattere prioritario per la competitività dell'Italia già identificati nelle "Linee Guida per la Politica Scientifica e Tecnologica del Governo" approvate il 19.4.2002 dal C.d.M e dal CIPE4.

## 1.4 IL PROGETTO BIO-HYDRO

Il progetto di ricerca BioHydro si può collocare nell'ambito dell'asse 2 per la ricerca "mission oriented" identificato nel PNR 2005-2007 che comprende il sostegno della ricerca di base orientata allo sviluppo di tecnologie chiave abilitanti a carattere multisettoriale. Il progetto di ricerca proposto è di interesse per diversi settori strategici: Ambiente, Trasporti, Energia, Agro-alimentare.

Il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (MIPAF) nel PNR ha fornito delle indicazioni di priorità dalle quali figura il riconoscimento del ruolo multifunzionale dell'agricoltura, fondamentale per l'attuazione e gestione di uno sviluppo sostenibile nelle sue diverse connotazioni. Il progetto in oggetto segue questo indirizzo proponendosi di valorizzare i sottoprodotti di scarto del settore agroalimentare come materia prima per processi di produzione di biocarburanti e fonti rinnovabili di energia.

### Sintesi e organizzazione generale del progetto

Il progetto BIO-HYDRO si propone di sviluppare un ciclo di smaltimento di scarti organici del settore agro-zootecnico consistente nella fermentazione ad idrogeno di almeno una tipologia di scarto agro-zootecnico, e nella co-digestione a metano del residuo di tale processo con altri scarti agro-zootecnici e/o con la frazione organica dei rifiuti solidi urbani. Il progetto si propone quindi in primo luogo di mettere a punto ed ottimizzare, su scala di laboratorio, un impianto a due stadi di fermentazione ad idrogeno, con purificazione tramite modulo a membrana dell'idrogeno prodotto, e successiva co-digestione dell'effluente con altri scarti organici. Sulla base dei dati sperimentali prodotti, e della messa a punto di un modello cinetico, fluidodinamico e della separazione dell'idrogeno tale da simulare il processo complessivo, verrà redatto il progetto preliminare di un impianto per l'attuazione del processo su scala pilota. La realizzazione e la conduzione di tale impianto sono previste nell'ambito di una successiva fase di sviluppo del progetto (follow-up), per la quale un significativo sforzo nell'ambito di BIO-HYDRO sarà orientato al coinvolgimento di partner interessati e di fonti di finanziamento.

Le attività del progetto sono affidate a cinque Unità Operative (UO), delle quali quattro, caratterizzate da competenze diverse e complementari, si collocano in Dipartimenti dell'Università degli Studi di Bologna, mentre la quinta è la multiutility HERA SPA, che gestisce la raccolta e lo smaltimento dei rifiuti, la potabilizzazione e depurazione delle acque, la distribuzione del gas naturale e dell'energia elettrica e la produzione di compost nelle province di Bologna, Modena, Forlì-Cesena, Faenza, Rimini, Ravenna e Ferrara. Questa scelta dei partner del progetto consente di conseguire un'utile integrazione fra i partner scientifici ed un partner fortemente operativo. Il progetto è caratterizzato da un forte radicamento nel territorio in cui operano le cinque UO. BIO-HYDRO si propone infatti, in primo luogo, di partire dalle esigenze di smaltimento di scarti organici espresse dalle aziende agricole e dalle industrie alimentari del territorio, tramite un'analisi della disponibilità e delle caratteristiche degli scarti agro-zootecnici nel territorio, dalla quale scaturirà la scelta di un ristretta gamma di scarti su cui eseguire i test sperimentali. BIO-HYDRO si propone poi, attraverso le sue attività conclusive, di ritornare alle esigenze del territorio: verrà infatti testata l'utilizzabilità del bio-idrogeno, purificato tramite il processo a membrana, nelle fuel-cell gestite da

HERA SPA e, in collaborazione con i gestori degli impianti di compostaggio di HERA SPA, saranno determinati i pre-trattamenti necessari per l'utilizzabilità quale compost dell'effluente finale del processo. Ciò consentirà, se gli obiettivi generali del progetto saranno conseguiti, di mettere a punto un ciclo virtuoso di smaltimento di matrici organiche, consistente nella conversione di tali matrici da una parte in gas ad elevato potere calorifico, e dall'altra in fertilizzanti per l'agricoltura. Tale ciclo di smaltimento risulterebbe particolarmente interessante per applicazioni locali dei processi oggetto di questa ricerca, a livello di singola azienda agricola o industria alimentare, o di consorzio locale di tali aziende; questa soluzione consentirebbe infatti alle aziende di ridurre i costi di smaltimento delle matrici di scarto organiche, di effettuare co-generazioni locali di energia elettrica e calore e, nel caso di aziende agricole, di disporre di fertilizzanti, secondo il principio della filiera corta.

Inoltre, considerate l'analogia di composizione di alcuni scarti agro-zootecnici con quella delle frazioni organiche dei rifiuti urbani (frazione organica putrescibile - FOP, e frazione organica dei rifiuti solidi urbani - FORSU) e l'inclusione di FOP e FORSU fra le matrici sottoposte ai test di co-digestione anaerobica, i risultati positivi della sperimentazione potrebbero comportare ricadute di grande rilievo anche nel settore dello smaltimento della frazione organica dei rifiuti urbani. Il progetto può quindi contribuire a mettere a punto anche per quest'ultima un ciclo virtuoso di conversione in compost e gas ad alto potere calorifico, con importanti ricadute su un settore che attualmente rappresenta, in alcune Regioni italiane, un'emergenza di primo piano.

Il progetto si articola in 7 macro-linee di ricerca, rappresentate nello schema a blocchi riportato in figura 1.13. In tale schema si può osservare che ogni macro-linea, per la sua complessità, richiede l'affiancamento di diverse competenze, messe a disposizione dalle diverse UO. Le UO lavoreranno quindi in stretta interazione; l'efficacia di tale interazione è garantita, oltre che dall'esperienza e dal continuo monitoraggio che verrà svolto dal coordinatore generale, dalla decennale esperienza di collaborazione scientifica fra i quattro partner universitari di BIO-HYDRO. Dall'osservazione dello schema a blocchi e dalla descrizione delle attività riportati (Figura 1.13), emerge la forte interdisciplinarietà del progetto. Le attività previste richiedono infatti competenze in campi ampiamente diversificati, quali biologia, biotecnologie, reattori chimici, separazioni a membrana, modellazione fluidodinamica, analisi economica di processi produttivi, gestione di reflui e della produzione di energia; per alcuni di questi campi inoltre sono richieste competenze inerenti sia le attività di ricerca sperimentale, sia lo sviluppo di modelli interpretativi e di scale-up dei processi testati. Le UO mostrano di possedere le esperienze gestionali e di ricerca, sia sperimentale che modellistica, che consentono di coprire la gamma delle competenze richieste. L'approfondita esperienza delle UO universitarie nell'acquisizione e gestione di finanziamenti dell'Unione Europea costituisce inoltre un importante presupposto per l'ulteriore reperimento di fondi per la fase di follow-up del progetto, consistente nella realizzazione e conduzione di un impianto pilota di produzione combinata di idrogeno e metano, con purificazione in linea dell'idrogeno.

Oltre agli obiettivi generali sopra riportati, il progetto include alcuni obiettivi scientifici rilevanti, il cui raggiungimento è indipendente dal conseguimento degli obiettivi generali: l'ampliamento



delle conoscenze sulla fisiologia ed il metabolismo di specifici ceppi batterici che stanno acquisendo una sempre maggiore interesse in diversi campi applicativi; l'accoppiamento di modelli cinetici di bio-produzione di idrogeno e metano in bioreattori multifase alla modellazione CFD (computational fluid-dynamics) di tali bioreattori, utile ai fini dell'ottimizzazione delle condizioni operative e dello scale-up dei processi biotecnologici; la messa a punto di innovative tipologie di bioreattori a biomassa adesa, con possibili ricadute su tutti i processi biotecnologici; l'avanzamento delle conoscenze sui processi a membrana di purificazione dell'idrogeno, con possibili ricadute sui processi di produzione di idrogeno da idrocarburi.

Il conseguimento degli obiettivi del progetto BIO-HYDRO consentirà un apprezzabile avanzamento rispetto all'attuale stato dell'arte sulla bio-produzione di idrogeno e sulla co-digestione anaerobica. In particolare, sono considerati elementi innovativi scarsamente studiati nella letteratura in materia: la produzione di idrogeno in condizioni termofile con ceppi batterici *Thermotoga*; la messa a punto di innovative tipologie di bioreattori a biomassa adesa, quali il structured packing continuous stirred tank reactor; la co-digestione anaerobica dell'effluente del processo di fermentazione ad idrogeno con la frazione organica di rifiuti solidi urbani ottenuta da raccolta indifferenziata (FORSU); la separazione dell'idrogeno dal biogas prodotto, la minore conversione dell'idrogeno a metano da parte di consorzi metanogeni, e la maggiore purezza dell'idrogeno prodotto.

Da quanto sopra esposto emerge che il progetto BIO-HYDRO potrà avere significative ricadute scientifiche, economiche, sociali ed ambientali. Oltre a quelle già citate, si evidenziano inoltre l'aumento di competitività di aziende agricole ed industrie alimentari, e l'incremento della produzione di energia (termica ed elettrica) da fonti rinnovabili.

Le attività di ricerca corrispondenti alle 7 macro-linee rappresentate in Figura 1.13 sono state articolate in 12 work-package (WP), ognuno dei quali è a sua volta suddiviso in task. Questa articolazione consente sia di assegnare con chiarezza ogni sotto-attività ad una specifica UO, sia di consentire ai coordinatori di UO ed al coordinatore generale di effettuare un adeguato monitoraggio del conseguimento dei risultati attesi, e quindi di intraprendere prontamente le eventuali azioni correttive necessarie. Infatti, come risulta dalla tabella riportata in figura 1.13, ogni attività si traduce in uno specifico risultato atteso, al quale sono associati un'UO responsabile per il suo conseguimento, un mese di previsto inizio dell'attività ed un mese di previsto conseguimento del risultato. Questa impostazione consente ai coordinatori delle UO di effettuare un attento monitoraggio dello svolgimento delle varie attività.

Elenco delle Unità Operative (UO) partecipanti e di eventuali collaborazioni esterne:

- UO 1: “Ingegneria dei reattori chimici” (Dipartimento di Ingegneria Chimica, Mineraria e delle Tecnologie Ambientali, Università degli Studi di Bologna);
- UO 2: “Ingegneria dei processi di separazione” (Dipartimento di Ingegneria Chimica, Mineraria e delle Tecnologie Ambientali, Università degli Studi di Bologna);
- UO 3: “Biotecnologie” (Dipartimento di Chimica Applicata e Scienza dei Materiali, Università degli Studi di Bologna);
- UO 4: “Microbiologia” (Dipartimento di Biologia Evoluzionistica e Sperimentale, Università degli Studi di Bologna);
- UO 5: “HERA SPA” (Holding Energia Rifiuti Ambiente SPA).

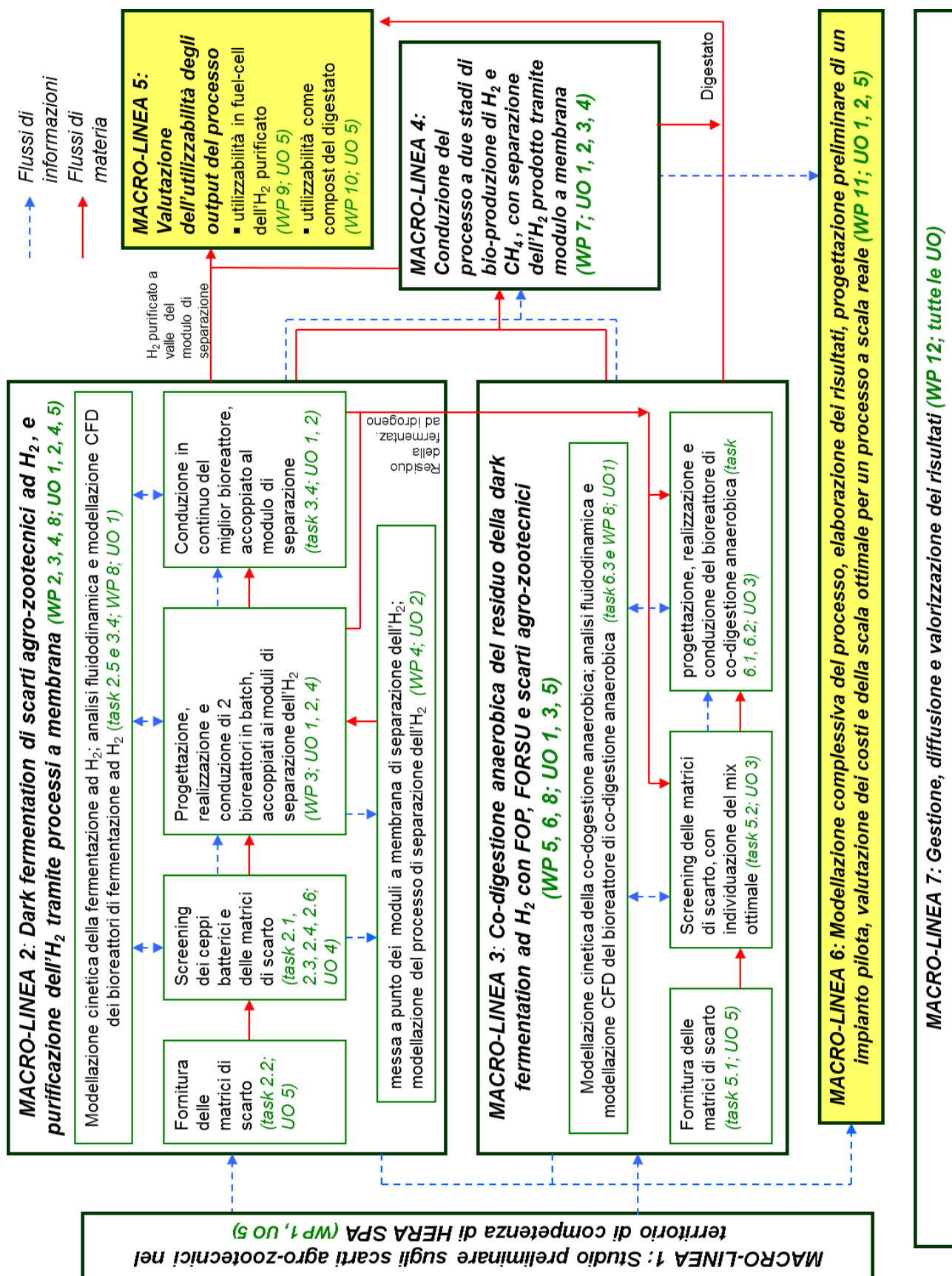


Figura 1.1: schema del progetto Bio-Hydro

## LA MACROLINEA IN CUI È STATA SVOLTA L'ATTIVITÀ DI DOTTORATO

Durante i 3 anni di dottorato il sottoscritto ha svolto attività di ricerca all'interno della macro-linea 2: **“Dark fermentation di scarti agro-zootecnici ad H<sub>2</sub> e purificazione dell'idrogeno tramite processi a membrana”**. È per tanto opportuno soffermarsi sulla macro-linea in oggetto facendone una panoramica generale e descrivendone brevemente gli obiettivi.

Questa macro-linea, focalizzata sulla prima parte del processo a due stadi di bio-produzione di H<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub>, è suddivisa in 4 Work Packages (WP). In primo luogo, si effettuerà uno screening iniziale consistente in test di bio-produzione di idrogeno in reattori batch di piccola dimensione, per la selezione dei ceppi batterici e della matrice di scarto da impiegare nelle successive fasi del progetto (WP 2). Lo screening si articolerà nelle seguenti attività: scelta, reperimento e stoccaggio dei ceppi batterici (del genere *Thermotoga*) per l'inoculazione dei test di fermentazione ad H<sub>2</sub> (task 2.1); reperimento delle matrici di scarto ritenute più idonee alla bio-conversione ad idrogeno (task 2.2); conduzione di test di bio-produzione di idrogeno in reattori batch di piccola dimensione, finalizzati sia all'individuazione di 1-2 ceppi *Thermotoga* e di 1 matrice di scarto da utilizzare nei successivi test di fermentazione ad H<sub>2</sub> in bioreattore, sia all'ottenimento di informazioni preliminari sulla quantità di H<sub>2</sub> prodotto, utili per la messa a punto dei moduli a membrana di separazione di tale gas (task 2.3); valutazione tramite il sistema MBEC™ (poi non utilizzato) della capacità dei ceppi *Thermotoga* di produrre biofilm, aspetto di particolare rilevanza poiché nei successivi test di produzione di H<sub>2</sub> in bioreattori batch e continui (WP 3) si prevede di impiegare processi a biomassa adesa (task 2.4); elaborazione dei dati e messa a punto di un modello cinetico del processo (task 2.5); caratterizzazione microbiologica dei consorzi batterici presenti nei test più significativi, finalizzata sia alla valutazione della persistenza dei ceppi *Thermotoga* in presenza dei consorzi microbici associati alle matrici di scarto utilizzate, sia alla possibile individuazione di consorzi batterici efficaci nella dark fermentation ad H<sub>2</sub> di specifiche matrici di scarto (task 2.6).

Parallelamente a tale screening, verranno svolte due attività funzionali alla successiva messa a punto, conduzione e modellazione di due bioreattori di dark fermentation ad idrogeno. In primo luogo, ai fini della produzione di una corrente di idrogeno con elevato grado di purezza, il WP 4 sarà finalizzato alla progettazione e realizzazione di moduli a membrana per la purificazione dell'H<sub>2</sub>, ed alla modellazione di tale processo di separazione. Tale WP, articolato in 5 task descritti nella scheda dell'UO 2 “Ingegneria dei processi di separazione”, comporta lo svolgimento di test preliminari per la scelta di uno o più materiali per le membrane, l'individuazione del materiale e della geometria per i moduli, la realizzazione dei moduli, la conduzione di test di purificazione dell'H<sub>2</sub> utilizzando miscele di gas aventi le composizioni desunte dai test preliminari di cui al WP 2, e la modellazione del processo di separazione. Nel WP 4 si prenderà in esame l'effetto sul processo di separazione della possibile presenza nel biogas di ammoniaca e acido solfidrico. In secondo luogo, sarà svolta un'attività di caratterizzazione e modellazione fluidodinamica svolta su prototipi dei bioreattori per la dark fermentation ad H<sub>2</sub> (WP 8: parte relativa ai bioreattori di dark fermentation ad H<sub>2</sub>). Tale attività, descritta in dettaglio nella scheda dell'UO 1 “Ingegneria dei reattori chimici”, sarà finalizzata ad una corretta individuazione della tipologia e delle condizioni di

mixing nei bioreattori di conversione ad H<sub>2</sub>, e consentirà inoltre, tramite l'applicazione di tecniche CFD, di effettuare una modellazione fluidodinamica del processo sviluppato in tali reattori, aspetto cruciale sia per l'ottimizzazione degli aspetti reattoristici/ fluidodinamici, spesso trascurati negli studi di bio-produzione di H<sub>2</sub>, sia per lo scale-up del processo e la progettazione di un reattore pilota.

L'attività di questa macro-linea si completerà quindi con la progettazione, realizzazione e conduzione dei bioreattori di bio-conversione ad idrogeno (WP 3), descritta per esteso nella scheda dell'UO 1. Dopo aver progettato e realizzato due tipologie di bioreattori a bimoassa adesiva (task 3.1), in ogni bioreattore si effettuerà una dark fermentation in modalità batch per ognuno dei ceppi batterici *Thermotoga* selezionati nel WP 2, inoculando i bioreattori con sospensioni batteriche prodotte tramite crescita in fermentatore (task 3.2, 3.3); non appena saranno disponibili i moduli a membrana per la purificazione dell'H<sub>2</sub> prodotto, i test proseguiranno accoppiando ogni bioreattore ad un modulo; quindi, con il bioreattore ed il ceppo batterico che avranno dato la migliore produttività in H<sub>2</sub>, sarà eseguito un test di conduzione in continuo del processo, con ottimizzazione delle condizioni operative e validazione del modello cinetico di produzione di H<sub>2</sub> messo a punto nell'ambito del WP 2 (task 3.4); saranno poi effettuate analisi della composizione del consorzio batterico presente in ogni bioreattore al termine di ogni test in batch e del test in continuo (task 3.5).

Nello specifico della presente tesi la ricerca qui descritta è stata svolta nelle UO 4 e 1, con particolare attenzione prima allo screening dei ceppi batterici e delle matrici di scarto e poi alla progettazione, la realizzazione e la conduzione in batch e in continuo di un reattore per la produzione di idrogeno.

## 1.5 L'IDROGENO

### CHE COS'È L'IDROGENO E ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

L'idrogeno naturale è l'elemento più abbondante nell'universo e costituisce il 70-80% di tutta la materia. Sulla terra è il terzo elemento più abbondante ed è principalmente presente combinato con altri elementi nell'acqua, nella materia organica e nelle rocce.

In condizioni standard l'idrogeno molecolare ( $H_2$ ) è un gas non velenoso, incolore, inodore, insapore e completamente atossico. L'idrogeno è caratterizzato da un'alta diffusività e diventa infiammabile a concentrazioni in aria che vanno dal 4 al 75% in volume. Come combustibile l'idrogeno ha una bassa energia di attivazione e un Potere Calorifico Inferiore (PCI) molto alto, addirittura più del doppio rispetto a quello del metano (tabella ...). Un doveroso appunto è che il PCI è calcolato per massa di combustibile (1Kg) e la bassa densità dell' $H_2$  rispetto al metano rende difficile un confronto diretto fra i due. La ridotta densità inoltre influenza le possibilità di stoccaggio e trasporto dell'idrogeno.

Il suo peso specifico  $0.0899 \text{ Kg/m}^3$  lo rende 14,4 volte più leggero dell'aria; è questo il motivo per il quale non si trova sulla Terra ma sfugge al campo gravitazionale ed è disperso nello spazio. Si stima che nella crosta terrestre rappresenti solo lo 0.9% rispetto all'insieme di tutti i componenti; allo stato elementare si trova nelle emanazioni vulcaniche, nelle fumarole, nelle sorgenti petrolifere. Combinato con altri elementi lo si trova in molti composti come l'acqua, le sostanze minerali, gli idrocarburi e le molecole biologiche.

A temperatura ambiente l'idrogeno molecolare è chimicamente poco reattivo a causa dell'elevata stabilità delle molecole di  $H_2$ ; la reattività è molto maggiore quando si trova allo stato atomico. Alcuni metalli come ad esempio il platino ed il palladio hanno la proprietà di assorbire l'idrogeno molecolare favorendone la dissociazione in idrogeno atomico e per questo vengono utilizzati come catalizzatori nelle reazioni in cui esso è coinvolto.

Per ottenere l'idrogeno molecolare è necessario estrarlo dalle sostanze che lo contengono consumando energia; è questa la ragione per cui l'idrogeno non è una fonte primaria di energia, bensì un vettore energetico; caratteristiche come un'elevata densità energetica per unità di peso e la possibilità di ricavarlo da numerose fonti, rendono l'idrogeno un vettore molto promettente che può ridurre la dipendenza da petrolio e consentire la necessaria diversificazione delle fonti energetiche.

L'efficienza di qualsiasi processo di produzione dell' $H_2$  viene calcolata come segue:

$$\eta_{H_2} = \text{PCI}_{H_2} / E_{ps}$$

Dove  $\eta_{H_2}$  è l'efficienza termica finale dell'Idrogeno, PCI è, come abbiamo visto, il Potere Calorifico Inferiore che rappresenta l'energia rilasciata dalla combustione di 1 Kg di  $H_2$ , mentre  $E_{ps}$  è l'energia primaria consumata per produrre lo stesso Kg di  $H_2$ . Nella resa finale del processo

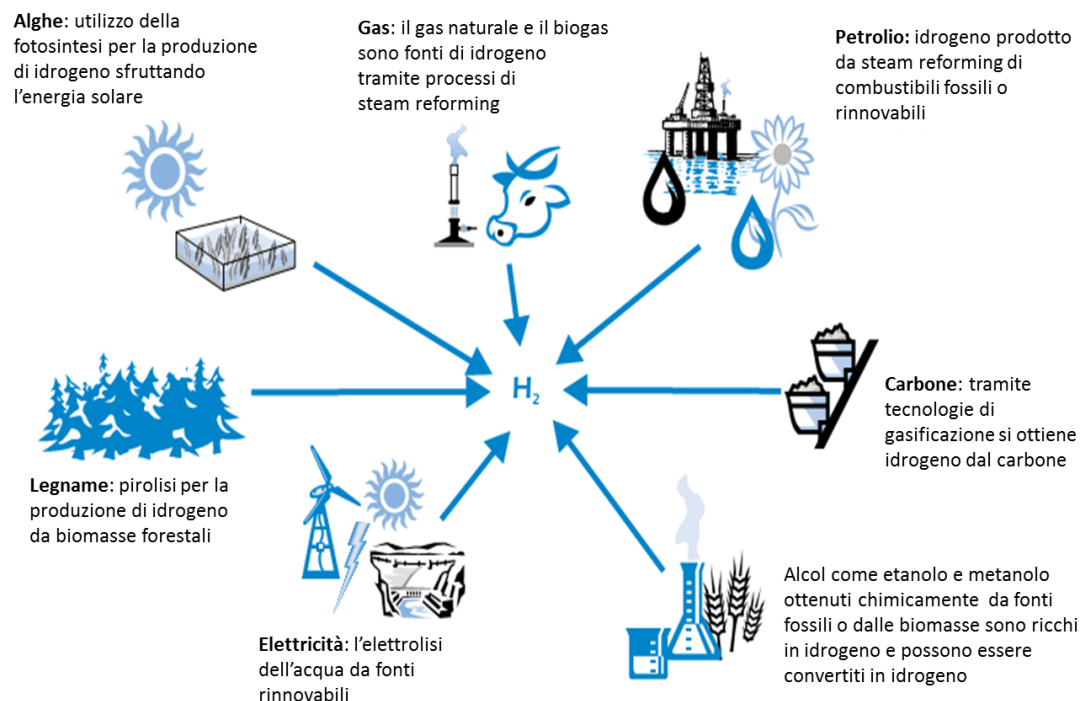
vanno inoltre considerati anche i prodotti di combustione (acqua) e quindi l'impatto economico/ambientale<sup>[3]</sup>.

**Tab. 1.1 – Proprietà chimico-fisiche dell'idrogeno molecolare (H<sub>2</sub>) confrontate con quelle del metano (CH<sub>4</sub>)<sup>[3]</sup>.**

	<b>H<sub>2</sub></b>	<b>CH<sub>4</sub></b>
<b>Peso Molecolare [g/mol]</b>	2	16
<b>Densità [kg/m<sup>3</sup>]</b>	0.0899	0.7168
<b>Pressione punto critico [bar]</b>	13	46.4
<b>Temperatura punto critico [°C]</b>	-240	-82.1
<b>Temperatura di ebollizione [°C]</b>	-252.8	-161.5
<b>Temperatura di fiamma [°C]</b>	2045	1875
<b>Potere Calorifico Inferiore (PCI) [MJ/kg]</b>	120.0	50.0
<b>Densità [kg/m<sup>3</sup>] (a 15°C, 101325 Pa)</b>	0.085	0.677
<b>ρ PCI [kJ/m<sup>3</sup>] (a 15°C, 101325 Pa)</b>	10234	37560
<b>Range di infiammabilità in aria [% V/V] (a 20°C, 101325 Pa)</b>	4÷75 %	5.3÷15 %
<b>Energia di attivazione [mJ]</b>	0.02	0.29
<b>Coefficiente di diffusione [cm<sup>2</sup>/s]</b>	0.61	0.15

## LA PRODUZIONE DELL'IDROGENO

L'idrogeno può essere prodotto partendo da diverse tipologie di risorse. Queste includono le fonti fossili, come ad esempio il gas naturale e il carbone, così come le fonti rinnovabili, come le biomasse con il contributo di fonti energetiche rinnovabili (eolico, solare, idroelettrico, moto ondoso). Una grande varietà di processi e tecnologie possono essere utilizzati, inclusi quelli chimici, biologici, elettrolitici, fotolitici e termochimici. Ogni tecnologia è ad un diverso stadio di sviluppo ed ognuna offre uniche combinazioni di opportunità, benefici e svantaggi. La disponibilità di risorse, la maturità della tecnologia, le applicazioni, la domanda di idrogeno, problemi politici e i costi possono influenzare la scelta e la tempistica delle diverse opzioni per la produzione di idrogeno. Una visione generale delle diverse tipologie di risorse e processi vengono presentate in Fig 1.14



**Figura 1.14: le diverse fonti da cui è possibile ottenere idrogeno**

Numerose tecnologie sono già disponibili sul mercato per la produzione industriale di idrogeno. La prima tecnologia che divenne commerciale negli anni '20 fu l'elettrolisi dell'acqua che produce idrogeno puro. Negli anni '60 però la produzione industriale d'idrogeno si spostò sull'utilizzo delle fonti fossili che restano la fonte principale dell'idrogeno prodotto oggi.



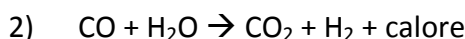
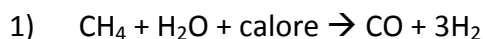
## IDROGENO DA FONTI NON RINNOVABILI

L'idrogeno può essere prodotto partendo da numerosi combustibili di origine fossile. Il prodotto di scarto di questi processi è l'anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) che deve essere quindi catturata per assicurare una sostenibilità ambientale del processo.

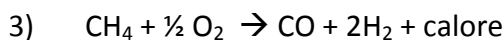
L'idrogeno può essere prodotto partendo dal gas naturale mediante tre diversi processi chimici:

- Steam reforming (Steam Methane Reforming – SMR)
- Partial oxidation (POX)
- Autothermal reforming (ATR)
- 

Durante lo SRM avviene una reazione endotermica del metano (CH<sub>4</sub>) e del vapore acqueo in idrogeno e CO<sub>2</sub>. Il calore necessario è spesso fornito dalla combustione di una quota del metano alimentato nel processo. Questa reazione avviene a 700 – 850°C e a pressioni dai 3 ai 25 bar. Il monossido di carbonio (CO) presente nel gas ottenuto (c.ca il 12%) deve essere convertito in CO<sub>2</sub>, per farlo si sfrutta la water-gas shift reaction (WGS) in cui il CO reagisce nuovamente con il vapore acqueo ottenendo così altro idrogeno.



La POX è un processo in cui l'idrogeno viene prodotto attraverso la parziale combustione di metano in miscela con l'ossigeno (O<sub>2</sub>). In questo caso la reazione è di tipo esotermico e non serve quindi calore per far avvenire la reazione.

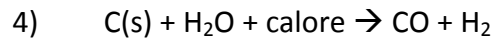


Il CO prodotto è poi convertito come già visto nel sistema SRM, mediante water-gas shift reaction.

L'ATR è una tecnologia che combina fra i due sistemi MSR e POX. Nel complesso si ottiene una reazione esotermica e la temperatura in uscita dal reattore si attesta fra i 950 e i 1100°C, la pressione del gas invece si avvicina ai 100 bar. Va considerato che la necessità di purificare il gas in uscita determina un aumento dei costi e riduce l'efficienza totale di questo tipo di processi.

In alternativa all'utilizzo del gas naturale l'idrogeno può essere prodotto partendo dal carbone attraverso diversi sistemi di gassificazione (a letto fisso, a letto fluido, a letto trascinato). Tutti

questi metodi impiegano vapore, ossigeno o aria, per ossidare parzialmente il carbone ed ottenere come risultato del gas. La reazione è endotermica e richiede quindi che le sia fornito calore.



Anche in questo caso la reazione WSR è la soluzione impiegato per l'eliminazione del CO generato dal processo. La tecnologia POX è oramai matura ma è anche più complessa rispetto all'utilizzo del gas naturale e il costo dell'idrogeno prodotto da carbone ha perciò un costo elevato.

Come accennato il principale sottoprodotto dei sistemi di produzione di  $\text{H}_2$  a partire dalle fonti non rinnovabili è la  $\text{CO}_2$ . Tale composto deve essere quindi rimosso e immagazzinato, tale procedimento è noto come decarbonizzazione. Essenzialmente esistono tre tipi di sequestro della  $\text{CO}_2$ :

- Post - combustione
- Pre - combustione
- Ossicombustione

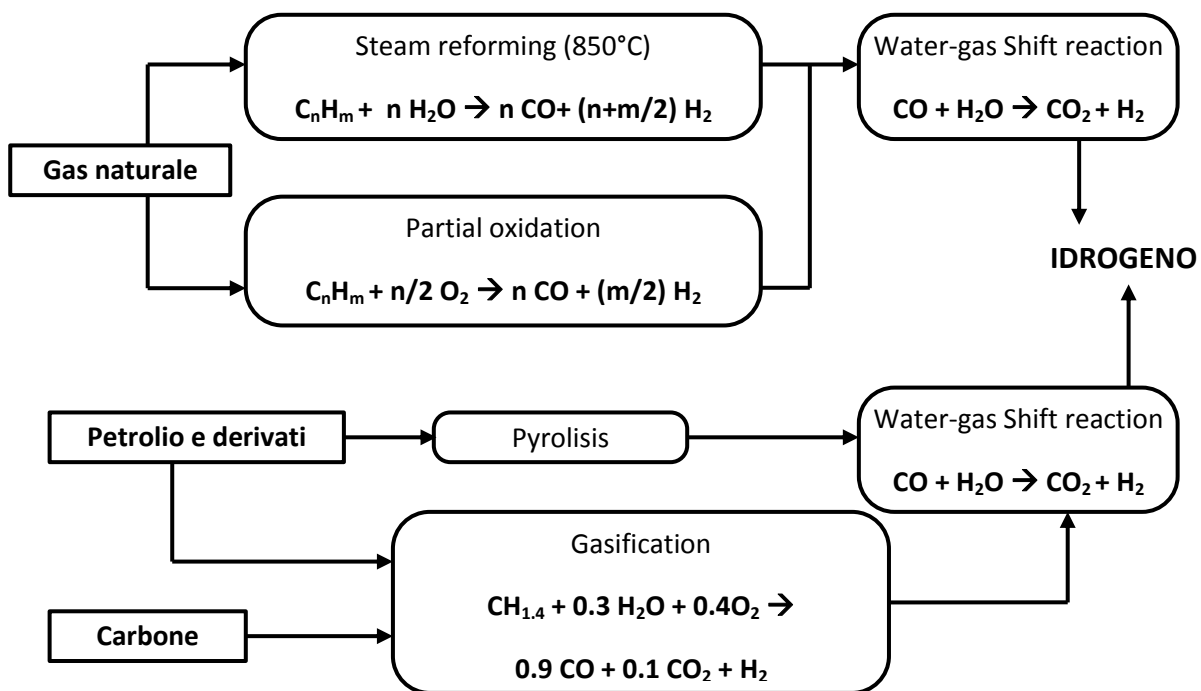


Figura 1.15: idrogeno da fonti non rinnovabili

## **IDROGENO DA FONTI RINNOVABILI**

Alcuni dei processi di seguito descritti sono condotti e portati a termine con produzione d'idrogeno mediante l'impiego di energia elettrica (vedi i processi di elettrolisi). Perché essi possano essere catalogati fra i sistemi sostenibili è condizione essenziale che essi prevedano l'utilizzo di energia elettrica proveniente da fonti rinnovabili. Di seguito vedremo i diversi processi per la produzione di idrogeno da fonti rinnovabili partendo dall'idrolisi dell'acqua, nel capitolo successivo parleremo della produzione di idrogeno dalle biomasse, approfondendo i sistemi biochimici.

### ***L'IDROLISI DELL'ACQUA***

La produzione d'idrogeno mediante idrolisi può avvenire in modi diversi. In buona sostanza vanno classificati in questa categoria i sistemi di elettrolisi, la biofotolisi e la decomposizione dell'acqua ad alte temperature.

L'elettrolisi dell'acqua è un processo in cui la rottura della molecola dell'acqua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) produce ossigeno e idrogeno molecolari ( $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2$ ) seguendo la reazione netta mostrata nell'equazione n 5.



Il processo elettrolitico richiede energia elettrica e termica. Il processo è favorito ad alte temperature, condizione in cui la richiesta di energia elettrica diminuisce. Quest'aspetto rende il processo più economico in quelle situazioni in cui è possibile fornire il calore di scarto derivante da altri processi produttivi. Una caratteristica che distingue i diversi sistemi di elettrolisi è la tipologia di soluzione elettrolitica utilizzata, essa può essere infatti acida o basica. L'elettrolisi alcalina che impiega soluzioni d'idrossido di sodio ( $\text{KOH}$ ) è una fra le tecnologie più mature. Esistono inoltre nuove tecnologie che sfruttano membrane a polimeri elettrolitici (PEM). In questo caso si hanno vantaggi di diversa natura come l'assenza di sostanze corrosive (ad esempio lo stesso  $\text{KOH}$ ), un design più compatto dei sistemi e l'operatività ad alte pressioni. Malgrado ciò la PEM è ad oggi una tecnologia, mostrando costi elevati, basse capacità e scarsa efficienza non è considerata una valida alternativa. In buona sostanza l'elettrolisi dell'acqua viene ritenuta una tecnologia verde solo se le fonti energetiche sono rinnovabili, un esempio è la foto elettrolisi.

### ***LA FOTO ELETTROLISI***

Il sistema impiegato per produrre  $\text{H}_2$  mediante foto elettrolisi si basa sulla accoppiata: cella elettrolitica e sistema fotovoltaico. Tale approccio ha una buona flessibilità dovuta al fatto che è possibile ottenere energia elettrica dal pannello fotovoltaico e impiegarla per la produzione di  $\text{H}_2$  mediante la cella elettrolitica. Con lo sviluppo delle tecnologie oggi sono disponibili sistemi integrati che fanno foto elettrolisi diretta. Le celle foto elettrolitiche, le cosiddette PEC. Tale tecnologia è ancora in fase di studio al fine di migliorare l'efficienza di conversione dell'energia solare in idrogeno.

## ***LA BIOFOTOLISI***

La produzione biologica d'idrogeno attraverso la fotosintesi consta di due parti, la fotosintesi appunto e la produzione vera e propria d'idrogeno catalizzata dalle deidrogenasi, particolari enzimi. Questa accoppiata è possibile solo mediante la coltivazione di organismi fotoautotrofi quali microalghe o di cianobatteri che hanno dimostrato la capacità di esprimere tali enzimi. Ad oggi questa tecnologia necessita di essere indagata ulteriormente ma se avrà successo si ritiene che sarà una delle strade più interessanti al fine di produrre bio-idrogeno a lungo termine. Per fare ciò si rendono fondamentali studi sul processo naturale e sulla regolazione genetica della produzione di  $H_2$ .

Le alghe verdi poste in condizioni anaerobiche possono utilizzare l' $H_2$  sia come donatore nel caso esso sia necessario alla fissazione della  $CO_2$  oppure possono produrre  $H_2$ . È stato dimostrato che durante un periodo di incubazione in ambiente anaerobico in assenza di luce gli idrogenasi vengono sintetizzate/ attivate e si osservano piccole produzioni di  $H_2$ . Riportando queste alghe in condizioni di illuminazione ma mantenendole in anaerobiosi la produzione di  $H_2$  aumenta. L'attività però scompare quando il normale sistema fotosintetico si ristabilisce (Rif Hydrogen production by biological processes 2001) questo può essere bloccato grazie ad un periodo di incubazione delle alghe in medium limitanti per lo zolfo (S) [14]. Un forte limite di questa tecnologia è l'elevata sensibilità del sistema enzimatico all'esposizione all'ossigeno. Anche i cianobatteri mostrano questo limite malgrado utilizzino un sistema leggermente diverso rispetto a quello utilizzato dalle alghe verdi. Nel metabolismo azotofissatore dei cianobatteri viene coinvolto l'azoto atmosferico ( $N_2$ ) e la catalisi è svolta dalle nitrogenasi oltre che dalle idrogenasi.

## ***L'IDROLISI TERMOCHIMICA DELL'ACQUA AD ALTE TEMPERATURE***

Eseguendo particolari reazioni chimiche in particolari condizioni ambientali è possibile scindere la molecola dell'acqua al fine di ottenere idrogeno. Tale sistema è conosciuto da circa 40 anni ed è stato particolarmente indagato fra gli anni '70 e '80 ma gode di scarso interesse negli ultimi anni. Un esempio di questa tipologia di approccio è il ciclo zolfo/iodio. Esso consta di tre reazioni principali difficili da mantenere in equilibrio, alcune di esse inoltre richiedono elevate temperature anche di  $850^\circ C$ .

## ***L'IDROGENO DA BIOMASSE***

Una delle più entusiasmanti e promettenti strade per la produzione di bio-idrogeno è sicuramente quella che trova origine nell'impiego della sostanza organica e quindi in quelle riserve altamente rinnovabili identificate con il nome: biomasse. Le biomasse possono essere di svariata natura e mostrano un caleidoscopio di caratteristiche che ne determinano fortemente le

possibilità di impiego. Esistono biomasse lignocellulosiche che comprendono tutte le specie vegetali erbacee ed arboree, la cui struttura è costituita da lignina e da cellulosa, carboidrati presenti come catene polimeriche ad elevata lunghezza; troviamo inoltre biomasse oleose quelle cioè che, di origine vegetale o animale, forniscono gli oli a seguito di processi di estrazione grande anche qui la varietà di acidi grassi che vanno a costituire l'olio ottenibile; abbiamo poi biomasse amidacee di origine vegetale che vengono ottenute da coltivazione cerealicole e altro come ad esempio il frumento, il mais, il sorgo da granella, il tritcale, il riso e la patata ed infine troviamo le biomasse dette saccarifere fra le quali si annoverano la canna da zucchero e la barbabietola da zucchero.

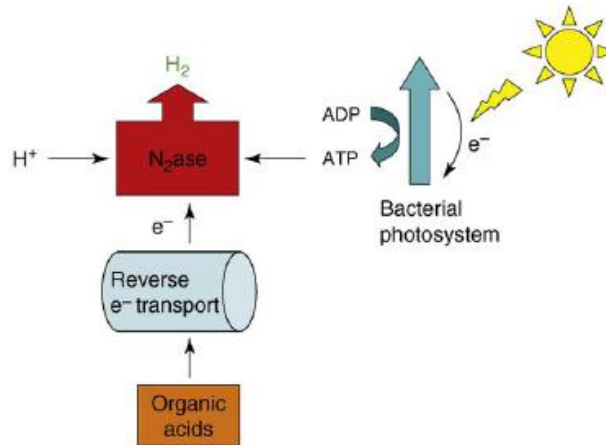
Questo breve appunto non è altro che una primissima classificazione delle biomasse che spesso, vista la loro origine, la loro stagionalità, la diversa dislocazione geografica e non da ultimo gli utilizzi antropici assumono caratteristiche molto variabili. Ogni biomassa quindi ha una sua origine e una sua storia, tali peculiarità non vanno denaturate al fine energetico bensì le biomasse sono da impiegare virtuosamente solo a seguito del loro impiego per fini nobili quali l'alimentazione del genere umano tutto.

I sistemi tecnologici a oggi conosciuti per la produzione d'idrogeno da biomasse sono diversi e possono essere suddivisi in processi termochimici e in processi biochimici. I primi, fra cui si annoverano la gassificazione e la pirolisi si basano sull'impiego del calore, l'azione termica fa scattare reazioni chimiche a seguito delle quali la materia organica viene trasformata. Tali sistemi sono stati concepiti e sono applicabili solo alle biomasse lignocellulosiche che mostrano un rapporto fra carbonio e azoto ( $C/N$ )  $> 30$  e umidità inferiore al 30%, quelle biomasse quindi che possono derivare da piante arboree a rapido accrescimento o da residui delle attività agricole, manutenzione verde urbano, residui di segherie e industria del legno e da alcune attività agro-industriali come ad esempio gusci e noccioli. I sistemi biochimici come la fotofermentazione e le fermentazioni in assenza di luce (Dark fermentation) permettono invece di ottenere energia tramite reazioni chimiche mediate dal metabolismo di alcuni esseri viventi, in particolare funghi e microrganismi. Questa tipologia di processi biochimici sono applicabili a quelle biomasse aventi un  $C/N < 30$  e umidità superiore al 30%. È possibile utilizzare reflui zootecnici, la frazione organica dei residui solidi urbani (FORSU) e alcuni sottoprodotti colturali e agro-industriali. Qui di seguito porrò maggiore attenzione a questa seconda tipologia di processo, quello biochimico, che è il topic della presente tesi.

### La foto-fermentazione

La fotofermentazione (Fig. ...) è condotta da batteri fotosintetici, i cosiddetti batteri rossi non sulfurei che hanno come maggiori rappresentanti *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, e *Rhodobacter spheroides*. Questi organismi utilizzano l'energia luminosa e la materia organica come fonte di elettroni necessari a ridurre la molecola di ferredossina. I substrati preferiti da questa classe di microorganismi come fonte di elettroni sono gli acidi organici a breve catena [1]. Il complesso enzimatico chiave di questi microorganismi è la Nitrogenasi che catalizza la riduzione dei protoni ad idrogeno molecolare [1]. Questa tipologia di fermentazione ha alte

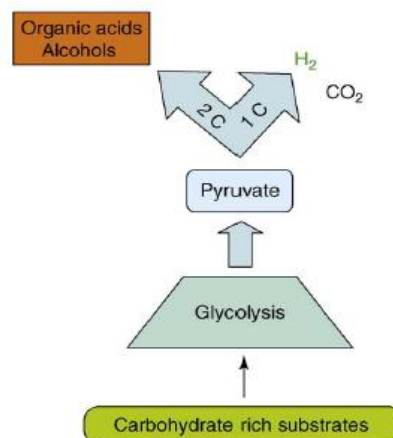
potenzialità di depurazione in quanto è in grado di ridurre drasticamente la materia organica presente nelle acque da trattare. Ad ogni modo però l'efficienza di conversione dell'energia luminosa è bassa e i reattori in cui far avvenire la foto-fermentazione sono costosi [cit...]. La figura 1.16 mostra schematicamente i passaggi della foto-fermentazione.



**Figura 1.16: Photofermentation. N2ase, nitrogenase; ATP(ADP), adenosine tri(di)phosphate[1]**

#### La fermentazione al buio (Dark Fermentation)

Veniamo ora all'argomento della presente tesi, la produzione d'idrogeno mediante dark fermentation. La fermentazione in assenza di luce, la cosiddetta dark fermentation appunto, viene svolta da microrganismi che scindono le molecole di carboidrati presenti nel medium di coltura e producendo idrogeno, anidride carbonica e altri prodotti di fermentazione, principalmente acidi organici e alcoli, in accordo con la via metabolica Embden-Meyerhof (Fig 1.17) Questa tecnologia non richiede energia luminosa ed è quindi svincolata dalla sua presenza o assenza, di conseguenza la reattoristica risulta essere di più semplice realizzazione ed economica. Inoltre un'ampia gamma di biomasse può essere utilizzata come substrato per la dark fermentation.



**Figura 1.17: Dark fermentation[1].**

Il piruvato derivante dalla glicolisi è la molecola chiave nella via catabolica che conduce alla produzione dell'idrogeno. A seconda del tipo di fermentazione sono due gli enzimi capaci di scindere la molecola di piruvato: la piruvato-formiato liasi (Pfl) nel caso di batteri che svolgono fermentazioni acido-miste, e la piruvato-ferredossina ossidoreduttasi presente nei metabolismi di tipo clostridico. In entrambi i casi, l'acetil coenzima A (Acetil-CoA) ottenuto dalla loro azione è poi convertito in acetato.

Nelle fermentazioni acido-miste (Figura 1.18) non si ha la diretta produzione di equivalenti riducenti a seguito della reazione che da piruvato porta alla formazione di Acetil-CoA e formiato. Il batterio quindi non ha un vantaggio dal fatto di produrre  $H_2$  a meno che non si manifesti un calo del pH del medium di cultura, spesso causato dallo stesso metabolismo batterico, che attiva il sistema Pfl. Quindi, la driduzione dei protoni accoppiata con l'ossidazione dell'acido formico mitigano l'acidificazione. La condizione di acidità promuove anche la conversione del piruvato in acido lattico con la formazione di una sola molecola di acido anziché due, acetato e formiato. Ad ogni modo gli equivalenti riducenti sono canalizzati in altre direzioni rispetto alla via di produzione di  $H_2$ . Siccome da una molecola di glucosio si ottengono due molecole di formiato, la resa massima teorica è di  $2H_2$ /glucosio [2].

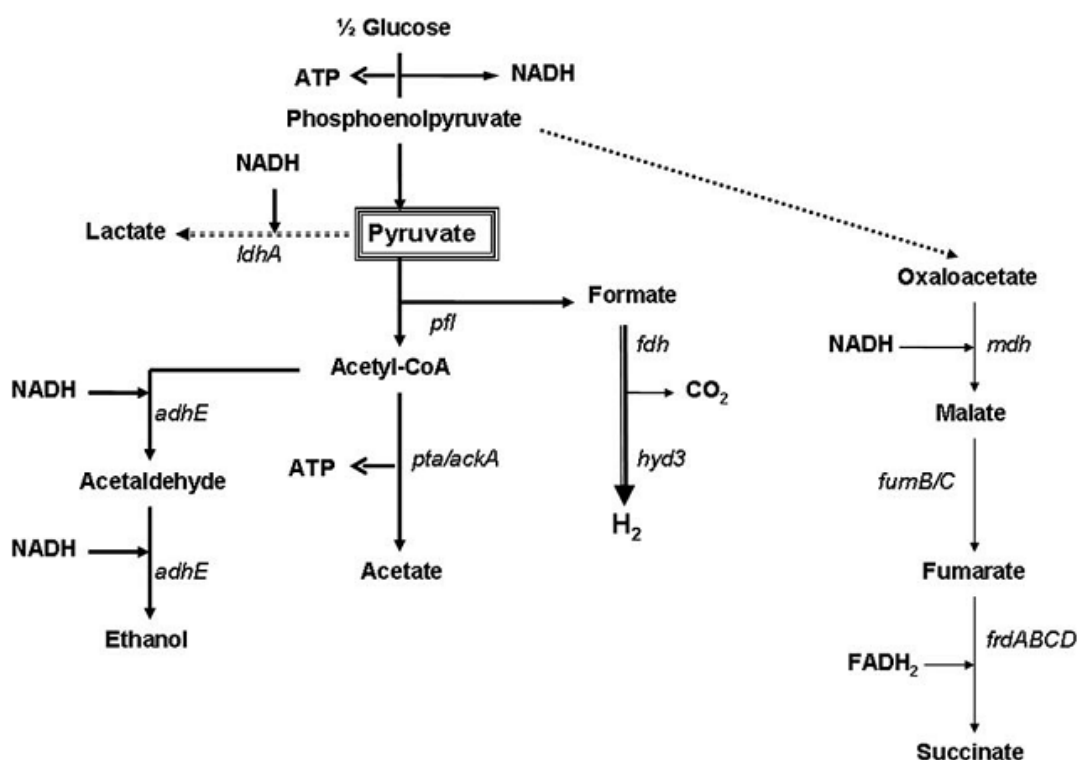
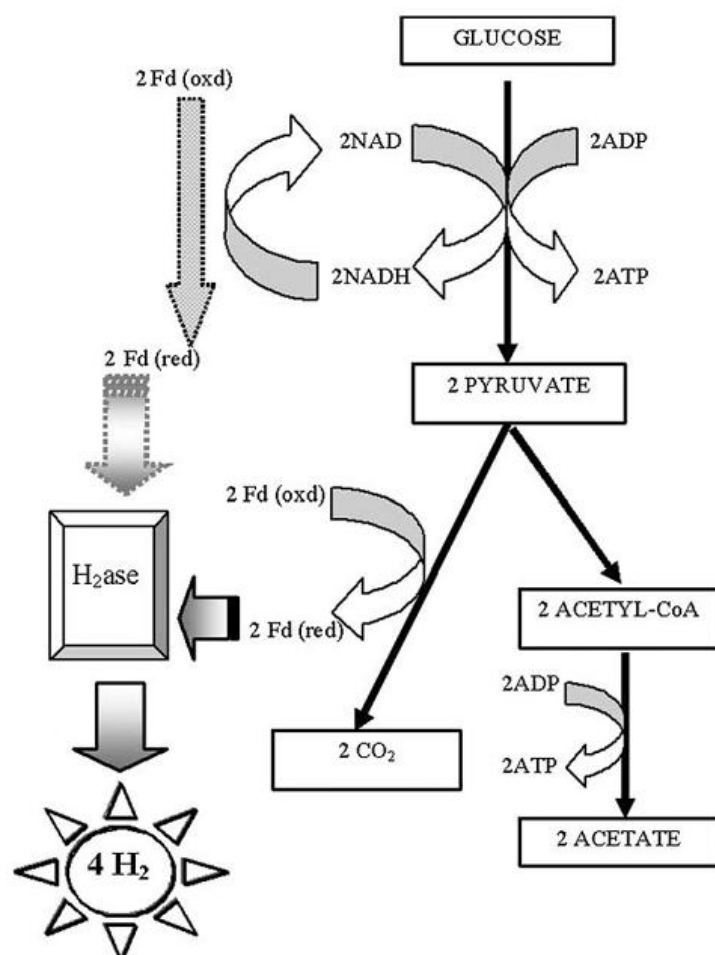


Fig. 1.18 – Fermentazione acido mista. Different fermentation products are possible with their relative fraction depending upon the microorganism, the redox state of the solution and the pH. Genes involved in hydrogen production pathways are also shown. *pfl*, pyruvate:formate lyase; *ldhA*, lactate dehydrogenase; *fdh*, formate dehydrogenase; *hyd3*, hydrogenase 3; *adhE*, alcohol dehydrogenase; *mdh*, malate dehydrogenase; *fumBC*, fumarate hydratase; *frdABCD*, fumarate reductase; *pta/ackA*, phosphotransacetylase/acetate kinase [2].

Per quanto riguarda la fermentazione di tipo clostridico il piruvato viene convertito in acetato e  $\text{CO}_2$  producendo ferredossina ridotta dalla piruvato-ferredossina ossidoreduttasi (Pfor). La ferredossina ridotta trasporta gli elettroni ad una Fe-Fe idrogenasi la quale porta alla produzione di idrogeno (Fig ...). In questo tipo di fermentazione non è stato ancora chiarito come avvenga la riduzione dell'idrogeno attraverso l'ossidazione del NADH. Recenti lavori mostrano l'evidenza della presenza di una NADH-Ferredossina ossidoreduttasi. La glicolisi porta all'ottenimento di due molecole di NADH e di due molecole di Ferredossina ridotta, tale output determina la possibilità di avere rese in produzione di idrogeno di  $4\text{H}_2/\text{glucosio}$ . La riduzione del protone mediante NADH è una strada sfavorita a causa del potenziale redox dell'idrogeno ( $\sim 450\text{ mV}$  ad un pH neutro) che è molto più basso rispetto a quello della coppia NADH/NAD ( $\sim 320\text{ mV}$ ). Per questo motivo la produzione di  $\text{H}_2$  attraverso elettroni derivanti dal NADH è possibile solo in particolari condizioni ambientali: elevate temperature e basse pressioni parziali di  $\text{H}_2$  ( $P_{\text{H}_2}$ ) [2].



**Fig 1.19 – fermentazione di tipo clostridico con produzione di idrogeno[2]**

Basse rese e produttività rappresentano il maggiore ostacolo all'applicazione delle tecnologie biochimiche per la produzione di bioidrogeno. In particolare, nella dark fermentation, la barriera più grande all'ottimizzazione del processo è il peso che ricopre la termodinamica del

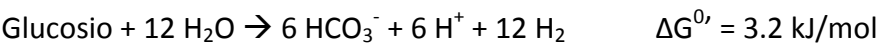


metabolismo che porta alla produzione d'idrogeno molecolare: 2 H<sub>2</sub> mol/glucosio (fermentazione acido mista) o 4 H<sub>2</sub> mol/glucosio (fermentazione di tipo clostridico) [13]. Per questo le rese sono limitate dalla produzione di sottoprodotti di fermentazione ridotti che causano la riossidazione del cofattore NADH che torna in glicolisi.

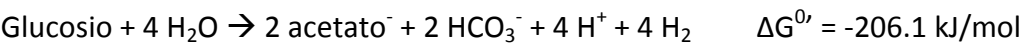
## 1.6 LA DARK FERMENTATION

### LA TERMODINAMICA DELLA PRODUZIONE DI IDROGENO NELLA DARK FERMENTATION

Le rese in idrogeno sfruttando sistemi biochimici che partono da substrati organici, in particolare dai carboidrati, sono fortemente condizionate dai parametri termodinamici delle reazioni che portano alla produzione di idrogeno. In condizioni standard (25°C, pH 7 e reagenti in concentrazione 1Molare) la completa ossidazione del glucosio a H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> mostra una variazione positiva dell'energia libera di Gibbs:



Per questo motivo la reazione non può avvenire senza un input di energia dall'esterno. È stato dimostrato che in condizioni ottimali è possibile ottenere la resa massima di 4H<sub>2</sub>/glucosio oltre che CO<sub>2</sub> e acetato. Ad esempio, se la pressione di idrogeno viene mantenuta bassa dalla presenza di batteri consumatori di idrogeno tutti i riducenti equivalenti sono trasformati in H<sub>2</sub>:



In molti processi catabolici (ad esempio quelli basati sull metabolismo Embden-Meyerhof) si ha la formazione di riducenti equivalenti in forma di NADH e ferredossina ridotta. Mediamente il potenziale redox delle coppie NAD<sup>+</sup>/NADH e ferredossina ossidata/ferresoddina ridotta sono rispettivamente di -320 e -398 mV [17] Altresì il potenziale redox H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub> è di -414 mV, quindi la riduzione del protone ad opera del NADH è termodinamicamente sfavorita, la situazione migliora considerando la ferredossina ma in tal caso la formazione di altri prodotti di fermentazione quali etanolo, lattato e alanina resta più favorita. In tabella1.2 sono elencate le energie libere di Gibbs necessarie per alcune reazioni di fermentazione molto comuni [18].

**Tab. 1.2 – Energia libera di Gibbs per diversi reazioni di fermentazione a condizioni standar <sup>[18]</sup>.**

Fermentative reaction	ΔG <sup>0'</sup> kJ/reaction
NADH + H <sup>+</sup> + pyruvate <sup>-</sup> → NAD <sup>+</sup> + lactate <sup>-</sup>	-25.0
2NADH + 2H <sup>+</sup> + acetyl-CoA → 2NAD <sup>+</sup> + ethanol + CoA	-27.5
NADH + H <sup>+</sup> + pyruvate <sup>-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> → NAD <sup>+</sup> + alanine + H <sub>2</sub> O	-36.7
NADH + H <sup>+</sup> → NAD <sup>+</sup> + H <sub>2</sub>	+18.1
2 ferredoxin(red) + 2H <sup>+</sup> → 2 ferredoxin(ox) + H <sub>2</sub>	+3.1

## FATTORI CHE INFLUENZANO LA PRODUZIONE D'IDROGENO PER VIA FERMENTATIVA

I fattori che influenzano la produzione d'idrogeno molecolare sono i seguenti: l'inoculo, il substrato, il tipo di reattore, la pressione parziale di  $H_2$ , le fonti di azoto e fosfato, gli ioni metallici, la temperatura e il pH [13, 19].

### L'inoculo

Numerosi sono i batteri utilizzabili per la produzione di idrogeno tramite dark fermentation. La tabella n 1.3 vuole darne una visione generale considerando il substrato utilizzato, la presenza del fenomeno di inibizione da cataboliti, il pathway metabolico, il trasportatore di elettroni, le caratteristiche delle idrogenasi e la produzione di sottoprodotti. I rappresentanti mesofili sono microrganismi che appartengono al genere dei *Clostridium*, hanno forma bastoncellare, sono gram negativi, anaerobi stretti capaci di produrre spore. Più avanti verranno descritti i microrganismi termofili. I clostridi sono anaerobi obbligati e alcuni di essi posseggono un complesso multienzimatico detto cellulosoma che a seconda dei componenti che lo costituiscono mostra abilità più o meno spiccate nella degradazione della cellulosa [20]. La produzione di idrogeno da parte dei clostridi è catalizzata dalla piruvato-ferredossina ossidoreduttasi (POR) e dalle Fe idrogenasi. Gli enterobatteri sono invece anaerobi facoltativi, quindi possono crescere in condizioni di aerobiche in cui la moltiplicazione cellulare è molto favorita. La produzione di idrogeno negli enterobatteri è catalizzata dalla piruvato-formiato liasi e della formiato-idrogeno liasi [21]. Colture di tipo misto arricchite con diversi tipi di fanghi sono stati oggetto di numerosi studi [19]. Questo è perché le colture di tipo misto, i consorzi batterici, sono più semplici da gestire e controllare, essi sono infatti molto più resistenti e tolleranti nel caso della variazione di parametri di fermentazione e in genere hanno una più ampia varietà di substrati. In condizioni di consorzi batterici però c'è la forte possibilità di trovare anche batteri idrogenotrofi (ad esempio i batteri metanogeni) e questo rende necessario un pretrattamento che mira ad evitare la crescita di tali batteri indesiderati i quali, d'altro canto, sono coloro che hanno funzione di mantenere basse la  $P_{H_2}$  portando all'ottenimento di alte rese di conversione dei carboidrati in  $H_2$  [1]. I pretrattamenti riportati in letteratura per sopprimere l'attività dei batteri idrogenotrofi includono shock termici ad alte temperature, aggiunte di acidi o di basi, l'aerazione, l'alternarsi di congelamento e scongelamento, l'utilizzo di cloroformio e iodopropano. La stessa natura di consorzio batterico determina che la composizione dello stesso varia con il passare del tempo, un modo possibile per aggirare questo problema è creare un consorzio definito, una comunità costituita da diversi membri con diverse capacità metaboliche capaci di creare una situazione di simbiosi [22]. Ad oggi però poco si conosce sulle complesse interazioni fra i diversi membri di una comunità batterica e sulle caratteristiche di stabilità del consorzio.

**Tab. 1.3 – Colture pure utilizzate per la produzione di idrogeno per via fermentative presenti in letteratura. EMP, Embden-Meyerhof-Parnas pathway; ED, Entner-Doudoroff pathway; PPP, pentose phosphate pathway; uptake, Ni-Fe type hydrogen uptake hydrogenase; PFL+FHL, pyruvate:formate lyase and formate:H<sub>2</sub> lyase; Fe-only, Fe-only evolution hydrogenase; FNOR, ferredoxin:NAD(P)H oxidoreductase; MBH, membrane bound hydrogenase; NMOR, NADH:methylviologen oxidoreductase<sup>[21]</sup>.**

Organism	Substrate	Catabolite repression	Central metabolism	Electron carriers	Hydrogenase	Reductant sink
<i>Enteric bacteria</i>	Glucose Xylose	Yes	EMP ED	NADH Formate	Uptake PFL+FHL	Lactate Succinate
	Starch		PPP	Ferredoxin	Fe-only	
<i>Clostridia</i>	Glucose Xylose Starch Cellulose Lignocellulose	Yes	EMP ED PPP	NADH Ferredoxin	Uptake Fe-only FNOR	Alcohol Organic acids Lactate
<i>Thermococcales</i>	β-Glucan Starch Maltodextrin	No	EMP (modified)	Ferredoxin	MBH NiFe-only FNOR	Alanine Ethanol
<i>Thermotogales</i>	Glucose Xylose Cellulose Starch Lignocellulose	Yes	EMP ED PPP	NADH Ferredoxin	Fe-only NMOR FNOR	Lactate Alanine
<i>Caldicellulosiruptor</i>	Glucose	?	EMP	NADH	Unknown	Lactate
	Xylose Cellulose Starch Lignocellulose			Ferredoxin		

## Il medium di coltura e la configurazione reattoristica

Numerosi studi riportano il range di concentrazioni ottimali per i substrati utilizzabili al fine di evitare fenomeni di inibizione da substrato. Un vasto numero di substrati è stato testato in studi di fermentazione per la produzione di idrogeno, esso racchiude fanghi, rifiuti di origine agricola o zootecnica, cellulose, lignina da residui di coltivazione, stocchi di cereali e rifiuti urbani [19].

Molti degli studi sono stati condotti in modalità batch per il fatto di essere più semplici sotto il profilo della conduzione. Inoltre questa tipologia di esperimento permette di ottenere dati più solidi. Tuttavia la necessità di sviluppare processi su larga scala richiede lo studio e la progettazione di reattori per la produzione in continuo. La tipologia di reattore maggiormente studiato sono il Continuous Stirred Tank Reactor (CSTR) e l' Up-flow Anaerobic Sludge Blanket reactor (UASB) e i reattori a ritenzione cellulare. Quest'ultimo è stato studiato per mantenere al suo interno un'alta concentrazione cellulare e potrebbe operare con tempi di ritenzione idraulica, in inglese Hydraulic Retention Time (HRT), ridotta. Il maggior vantaggio di questi reattori rispetto al CSTR è una maggiore produttività. L'intrappolamento delle cellule all'interno del reattore è ottenibile tramite fenomeni di granulazione, flocculazione o formazione di biofilm e molte varianti

di questo tipo reattoristico sono state studiate (Tab 1.4). Questa grande varietà di processi rende difficile il loro confronto viste le diverse configurazioni operative [1 - 19].

**Tab 1.4 –Configurazione dei reattori per la produzione di idrogeno <sup>[1]</sup>**

Microorganisms	Substrate	Type of reactor	H <sub>2</sub> rate (l H <sub>2</sub> /l/h)
Sludge (wastewater treatment plant)	Molasses	Continuous stirred-tank reactor (CSTR)	0.20
Sludge (wastewater treatment plant)	Glucose	Anaerobic sequencing batch reactor (ASBR)	0.23
Sludge (wastewater treatment plant)	Sucrose	Fixed bed bioreactor with activated carbon (FBBAC)	1.2
Activated sludge and digested sludge	Glucose	Anaerobic fluidized bed reactor (AFBR)	2.4
Sludge (wastewater treatment plant)	Sucrose	Upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB)	0.27
Anaerobic sludge	Sucrose	Polymethacrylate (PMMA) immobilized cells	1.8
Sludge (wastewater treatment plant)	Sucrose	Carrier-induced granular sludge bed (CIGSB)	9.3
Sludge (wastewater treatment plant)	Sucrose	Fluidized bed reactor (FBR)	1.4
Sludge (wastewater treatment plant)	Glucose	Anaerobic fluidized bed reactor (AFBR)	7.6 biofilm; 6.6 granules
Sludge (wastewater treatment plant)	Sucrose	Continuously stirred anaerobic bioreactor (CSABR)	15.0
Heat-treated soil	Glucose	Membrane bioreactor (MBR)	0.38

## La pressione parziale di idrogeno

La teoria afferma che una riduzione della pressione parziale di H<sub>2</sub> dovrebbe incrementare le rese di produzione nei microrganismi che svolgono una fermentazione di tipo clostridico. Numerosi studi confermano tale teoria, sono state osservate rese maggiori principalmente facendo gorgogliare un gas inerte attraverso il medium di coltura. I dati ottenuti da tali esperimenti però sono molto variabili. I valori di P<sub>H<sub>2</sub></sub> per la sintesi continua di H<sub>2</sub> sono stati definiti < 50 kPa a 50°C, < 20 kPa a 70°C e < 2 kPa a 98°C. Pertanto le temperature crescenti favoriscono il metabolismo della produzione d'idrogeno [13].

## L'azoto, il fosfato e gli ioni metallici

Un livello appropriato di azoto è essenziale per la crescita dei batteri produttori di idrogeno e quindi per avere una buona produzione di H<sub>2</sub>. La fonte di azoto più utilizzata sono i sali di ammonio. Anche altre fonti di azoto sono state prese in considerazione ad esempio il peptone, il brodo di soia (in inglese Tryptic soy broth TSB) o ancora l'estratto di lievito.

Il fosfato agisce da agente tampone ma è anche indispensabile come macronutriente per la sintesi degli acidi nucleici. È stato dimostrato che rapporti C/N e C/P ottimali sono rispettivamente di 50÷200 e 500÷1000 [19].

Anche i microelementi ed elementi in tracce sono importanti per mantenere un buon potenziale di membrana e altre caratteristiche fisiologiche. Inoltre essi giocano un ruolo importante nella struttura delle proteine e nella loro attività. In particolare il ferro (Fe) e il nickel

(Ni) sono cofattori molto importanti coinvolti perché presenti nelle idrogenasi, gli enzimi riduttori capaci di generare idrogeno molecolare partendo da elettroni e protoni [19].

## **La temperatura ed il pH**

Temperatura e pH sono parametri chiave per il controllo della dark fermentation. Nelle colture pure questi vanno regolati in base ai valori ottimali richiesti dal batterio in analisi. Per quanto riguarda la temperatura i batteri produttori di idrogeno appartengono a generi mesofili, termofili e ipertermofili. Il pH ottimale invece varia. A seconda del microrganismo impiegato da valori acidi (pH 4.2) fino a valori basici (pH 9.0) [19].

Quando si considerano colture miste invece, la temperatura e il pH influiscono sulla biodiversità del consorzio e possono essere impostati diversi valori durante le diverse fasi del processo: arricchimento dell'inoculo, pretrattamenti e fermentazione vera e propria. Inoltre la temperatura e il pH hanno effetto sui parametri fisici e chimici del terreno di coltura. Questo aspetto richiede particolari accorgimenti nella progettazione dell'impianto [19]

Durante la dark fermentation il pH del terreno di coltura scende drasticamente a seguito della produzione di acidi organici. Numerosi studi hanno mostrato quali sono i valori iniziali ottimali nelle colture di tipo batch. Le fermentazioni con sistemi in continuo comunque danno dati più accurati a proposito del valore di pH ottimale per la produzione d'idrogeno.

Come già descritto la temperatura è anche il pH sono profondamente coinvolti nella termodinamica del processo.

## **TECNICHE PER AUMENTARE LA PRODUZIONE DI IDROGENO PER VIA FERMENTATIVA**

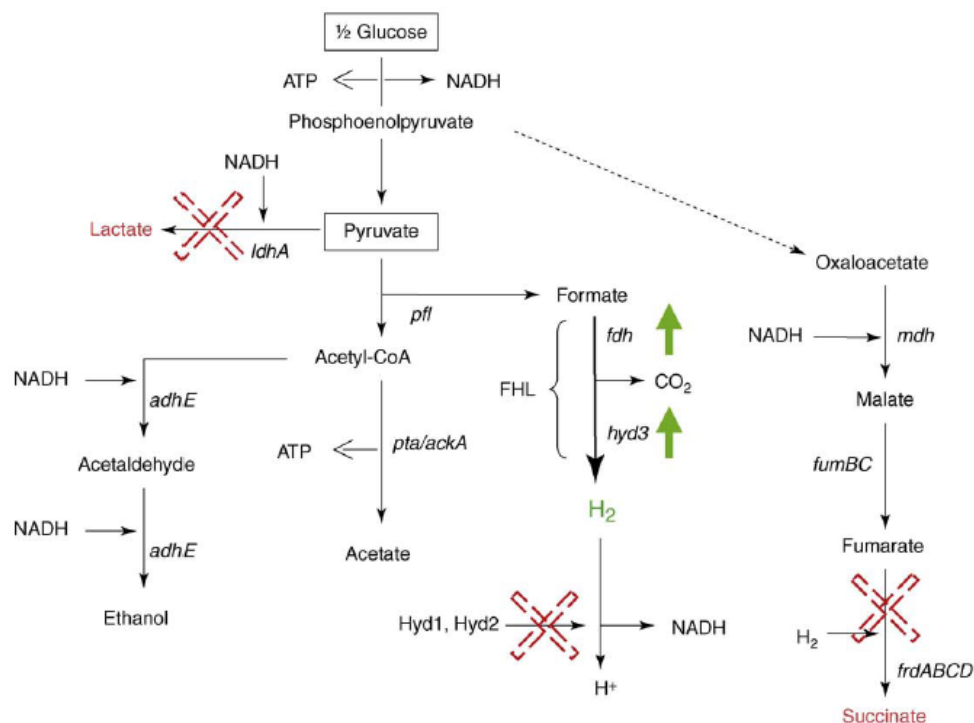
Oltre a fattori coinvolti nella produzione d'idrogeno di cui al paragrafo precedente, diversi studi si sono focalizzati sulle tecniche utili a migliorare la produzione di bioidrogeno. Queste tecniche sono principalmente di ingegneria metabolica e sistemi ibridi a due stadi.

### **L'ingegneria metabolica**

Le strade che l'ingegneria genetica affronta al fine di aumentare le produttività da parte dei batteri coinvolti sono essenzialmente due:

- Il miglioramento d'efficienza delle vie metaboliche
- L'introduzione di vie metaboliche estranee al microrganismo

Nel primo caso il risultato è teoricamente ottenibile mediante lo “spegnimento” di quelle vie metaboliche antagoniste alla produzione d'idrogeno oppure incrementando l'espressione omologa della via metabolica che porta alla sua produzione. Un esempio di ciò è visibile in Fig 1.20 . Numerosi studi hanno posto l'attenzione su *E. coli* in quanto il suo genoma è stato completamente sequenziato ed è di facile manipolazione, il suo è uno dei metabolismi batterici più studiati e compresi, è in grado di degradare una buona varietà di zuccheri e sono disponibili numerose strumenti genetici utili. Le mutazioni presentate in figura .. hanno aumentato le rese di produzione  $H_2$  fino al massimo di  $2H_2$ /glucosio.



**Fig. 1.20** – I pathways che competono con la produzione di idrogeno che sono stati bloccati vengono mostrati dalla croci rosse. Gli enzimi overespressi nella FHL (formate hydrogen lyase) sono indicati dalle frecce rosse [1].

Il secondo approccio mira ad ingegnerizzare *E. coli* inserendo nuove vie metaboliche per incrementare la produzione. Ad esempio un operone artificiale è stato utilizzato per creare una via metabolica che prevede la sintesi di una ferredossina [23 – 24]. Utilizzando un ceppo ospite già capace di produrre idrogeno (*E. coli* BL21(DE)) sono stati inseriti due plasmidi contenenti sei geni messi sotto il controllo del promotore inducibile IPTG-T7. I geni appartengono alla via metabolica per la produzione di idrogeno. Purtroppo i risultati osservati sono stati insignificanti in quanto il confronto fra wild-type e mutante ha evidenziato produzioni di idrogeno maggiori nel wild-type anziché nel mutante. Questo approccio di ingegneria genetica quindi necessita di ulteriori studi ed altre prove [1].

## Sistema ibrido a due stadi

Il principio su cui si basa un sistema ibrido è quello di tentare di estrarre l'energia chimica residua presente nell'effluente proveniente dalla dark fermentation mediante l'accoppiamento ad un altro processo fermentativo. Il secondo stadio così introdotto favorisce il superamento di alcuni limiti termodinamici della dark fermentation recuperando energia dai composti quali, principalmente, gli acidi organici. Altro vantaggio del sistema bistadio è quello di permettere un ulteriore abbassamento del COD del medium utilizzato, rendendolo meno inquinante e di più facile gestione. Esistono tre sistemi bistadio che sono attualmente sotto studio in impianti pilota (Fig. 1.21 ) [1] .

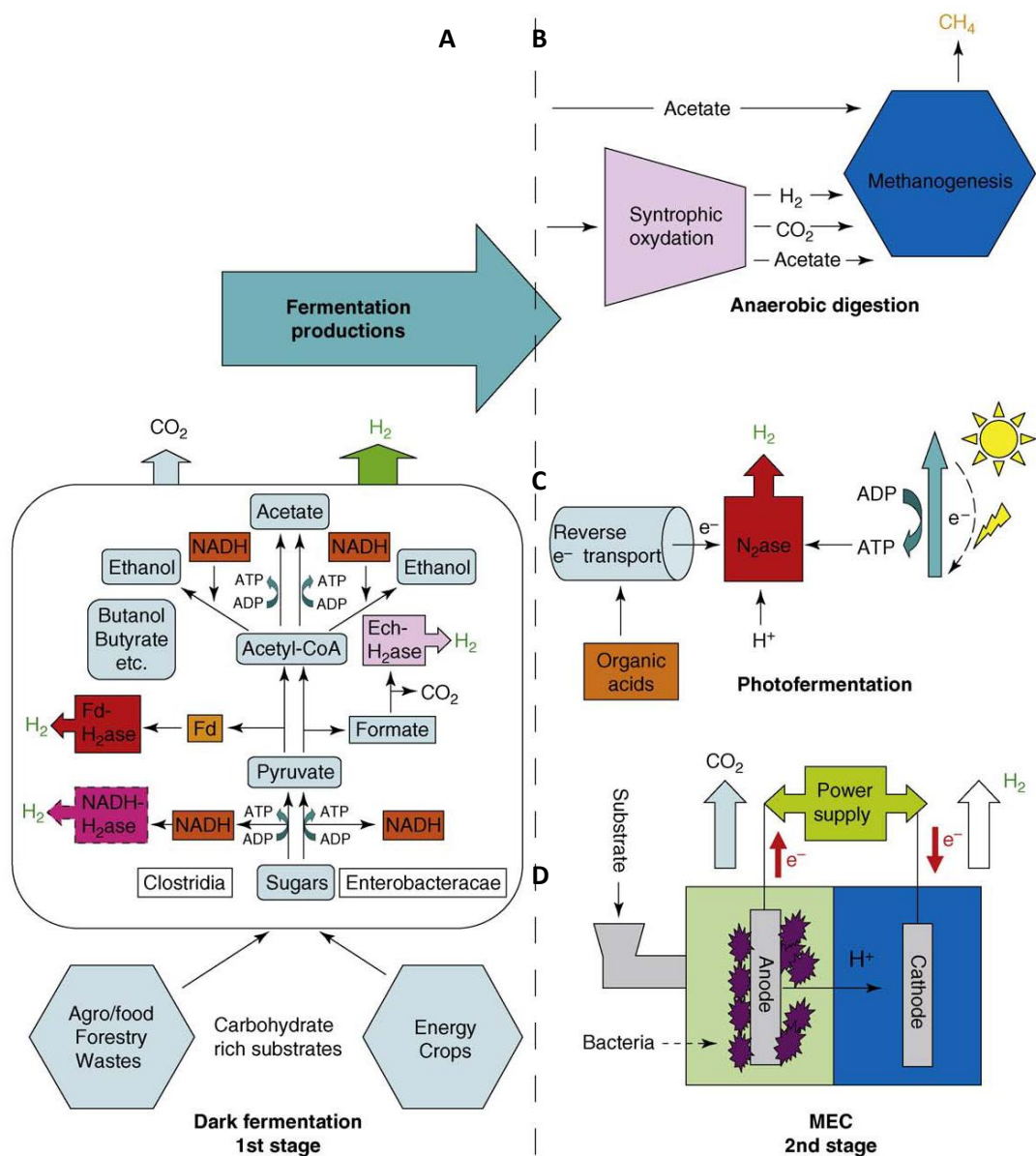


Fig. 1.21 – Diversi sistemi a due stadi per la completa conversione del substrato. Il primo ste (sulla sinistra) è una dark fermentation, il secondo step (sulla destra) invece può includere uno step di metanogenesi (B), fotofermentazione (C) o Microbial electrohydrogenesis cells, MCE (D) [1].



Nella figura 1.20B la dark fermentation è accoppiata con la metanogenesi. La produzione di due flussi di gas potrebbe essere vantaggiosa poiché miscele di idrogeno-metano risultano essere combustibili più ecologici rispetto al solo metano [1]. Questo sistema ibrido è stato già testato in impianti su scala pilota [25]. In tale studio l'impianto è stato capace di produrre flussi di idrogeno e metano relativamente alti di 5.4 e 6.1 L/L/d rispettivamente rimuovendo circa l'80% del COD. L'impiego della dark fermentation ha raddoppiato le produttività ottenibili impiegando esclusivamente il solo processo di metanogenesi [25].

Un'alternativa è quella di accoppiare alla dark fermentation un processo di fotofermentazione (Fig 1.20 C). Anche se teoricamente questa accoppiata è in grado di convertire completamente la sostanza organica in idrogeno la realtà è assai diversa. Infatti, come accennato, la fotofermentazione soffre di bassi tassi di conversione e ridotta produttività volumetrica di idrogeno, inoltre i reattori per questo tipo di processo sono molto costosi [1].

Ultima possibile accoppiata è quella che vede, accanto alla dark fermentation, l'impiego delle celle elettrolitiche microbiche (CEM). La CEM è una tecnologia molto recente in cui viene fornita elettricità ai batteri presenti nella cella, i quali che trasformano gli acidi organici in idrogeno (Fig 1.20 D ). Un sistema ibrido di questo tipo potrebbe teoricamente portare a rese di 12 H<sub>2</sub>/glucosio con un piccolo investimento in energia elettrica. Il limite maggiore restano le ridottissime produttività e le correnti attualmente testate sono ancora alte (~ 800 mV)[1].

## LE IDROGENASI

Le idrogenasi sono enzimi chiave del metabolismo che porta alla produzione di idrogeno. Questi enzimi appartengono alla classe delle ossidoreduttasi e catalizzano la reazione reversibile di ossidazione dell'idrogeno molecolare in protoni ed elettroni. In vitro questi enzimi solitamente catalizzano la reazione in entrambi le direzioni ma in vivo tipicamente catalizzano o l'ossidazione dell'idrogeno molecolare o la riduzione del protone H<sup>+</sup>, a seconda della via metabolica in cui sono inseriti. Questi enzimi sono stati individuati in tutti i domini della vita [26 g]. Le idrogenasi sono sensibili all'ossigeno e quindi, in organismi anaerobi facoltativi o microaerofili esse vengono espresse in condizione di basse concentrazioni di O<sub>2</sub>. [27]

Le idrogenasi vengono classificate in base al metallo presente nel loro sito catalitico: [NiFe] idrogenasi [28], [FeFe] idrogenasi [29] e [Fe] idrogenasi [30].

Le [NiFe] deidrogenasi (Fig. 1.22) hanno nel loro sito attivo un atomo di nickel (Ni) e un atomo di ferro (Fe). Il Ni ha numero di ossidazione variabile (I, II, o III) mentre l'atomo di Fe è Fe<sup>+2</sup> [29]. Una sottoclasse di questo enzima contiene un centro [NiFeSe].



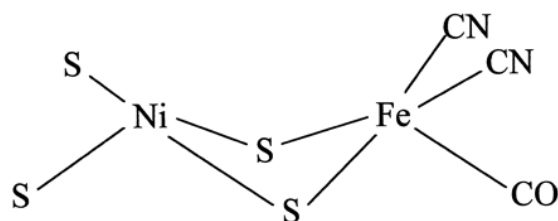


Fig. 1.22 – Centro di reazione di idrogenasi di *Desulfovibrio gigas*'s [NiFe] [31-32].

Le idrogenasi [NiFe] sono state spesso individuate nei batteri e negli archea ma non negli eucarioti. Tutte queste contengono almeno due diverse subunità e possono essere classificate in 4 gruppi: (i) enzimi respiratori che sono sistemi multienzimatici catalizzanti l'ossidazione dell' $\text{H}_2$  accoppiata con la riduzione di una molecola accettore di elettroni come ad esempio  $\text{SO}_4^{2-}$  o  $\text{NO}_3^-$  in condizioni anaerobiche oppure l' $\text{O}_2$  in condizioni aerobiche, (ii) sensori citoplasmatici  $\text{H}_2$  che attivano l'espressione di idrogenasi metabolicamente attive, (iii) enzimi di ossidazione citoplasmatica dell' $\text{H}_2$  che utilizzano l'idrogeno come donatori di elettroni per ridurre cofattori come ad esempio il NADP e (iv) idrogenasi di membrana che sono complessi multienzimatici accoppiati a cofattori che catalizzano l'ossidazione dell' $\text{H}_2$  tramite un pompaggio transmembrana di protoni.

Le [FeFe] idrogenasi sono filogeneticamente distinte e contengono una coppia Fe-Fe coordinate con gruppi CO e CN e centri FeS che dirigono il trasferimento di elettroni. Il centro operativo dell'idrogenasi contiene atomi di ferro e 4Fe4S collegati a ligandi cisteinici. Un esempio è il cluster della [FeFe] idrogenasi del *Clostridium pasteurianum* e mostrata in Fig. 1.23 [33].

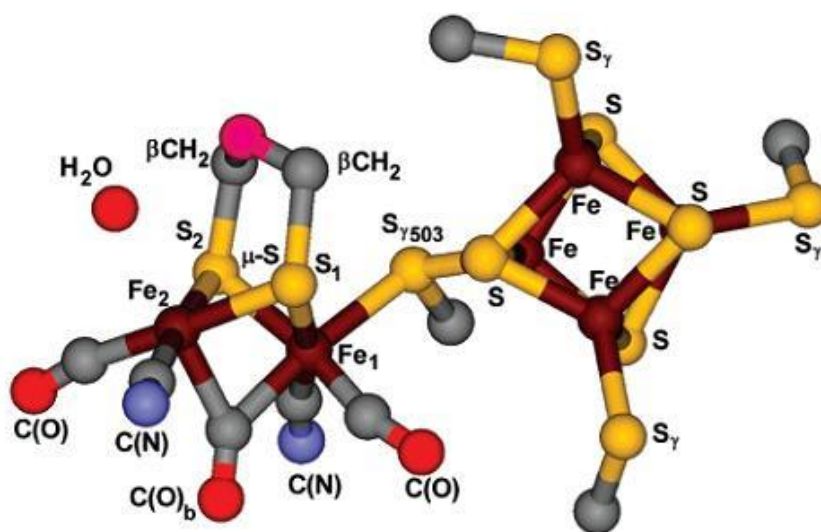


Fig. 1.23 – Centro di reazione catalitico di una [FeFe] hydrogenase di *Clostridium pasteurianum* [33].

Le FeFe idrogenasi sono state trovate solo in un limitato numero di batteri anaerobi e in alcuni eucarioti adattati alle condizioni anaerobiche. In molti casi essi sono enzimi monomerici che utilizzano elettroni per ridurre i protoni ad  $H_2$ [26].

Il terzo tipo di idrogenasi anch'esse filogeneticamente distinte dalle precedenti sono state individuate negli archea e contengono un centro di reazione con un unico atomo di Fe[26].

## LA PRODUZIONE D'IDROGENO AD ALTE TEMPERATURE

La conduzione di processi a temperature relativamente alte porta a determinati benefici, come ad esempio una più bassa viscosità del sistema, un miscelamento migliore, un miglioramento delle cinetiche. Molti studi inoltre dimostrano le spiccate abilità idrolitiche dei batteri termofili, ciò viene migliorato anche proprio dalle alte temperature che rendono più efficaci i processi di degradazione dei polisaccaridi.

Alcuni lavori inoltre hanno dimostrato che alcuni organismi ipertermofili come *Thermococcales* e *Thermotoga* hanno una sensibilità all'ossigeno ridotta rispetto ad altri anaerobi stretti [35]. Fra le altre cose la stabilità enzimatica dei batteri ipertermofili è superiore rispetto a quella di batteri mesofili e questo li rende interessanti per eventuali applicazioni in vitro. Altro aspetto molto importante è che le alte temperature inibiscono la crescita di batteri contaminanti.

Il limite maggiore nell'utilizzo dei microorganismi termofili o ipertermofili è la quantità di biomassa producibile, che è più bassa rispetto ai valori ottenibili con microrganismi mesofili. Questo aspetto si ripercuote negativamente sulle produzioni volumetriche di  $H_2$ . Per far sì che questi processi ipertermofili possano essere competitivi bisogna riuscire ad ottenere e mantenere alte concentrazioni di biomassa e nel contempo avere rese in  $H_2$  il più possibile vicine al limite teorico [2, 17, 21]. Anche se buona parte dei genomi dei batteri ipertermofili è stata sequenziata non è possibile applicare la attuali tecnologie di ingegneria genetica e microbiologia[36, 39].

## MICROORGANISMI IDROGENO-PRODUTTORI IPERTERMOFILI

I microrganismi termofili e ipertermofili sono quei batteri e archea che hanno rispettivamente un optimum di temperature sui 60 e gli 80°C[42]. Molti rappresentanti di questi gruppi sono anaerobi stretti capaci di produrre idrogeno per via fermentativa. Esempi di microrganismi termofili e ipertermofili produttori di idrogeno sono mostrati in tabella 1.5.

Tab. 1.5 – Panoramica dei microorganism termofili e ipertermofili produttori di idrogeno [18].

Organism	Domain	Temp. grown (°C)	Culturing type	Substrate	Reported end products	H <sub>2</sub> / hexose
<b>Thermophiles</b>						
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> YS485	B	55	Batch	Cellobiose	Acetate, lactate, ethanol	0.87
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2	B	60	Batch	Starch	Acetate, ethanol, butyrate	2.8
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	B	60	Chemostat	α-Cellulose	Acetate, lactate, ethanol, formate	1.65
<b>Hyperthermophiles and extreme thermophiles</b>						
<i>Thermotoga elfii</i> DSM 9442	B	65	Controlled batch	Sucrose	Acetate	3.3
		65	Batch	Glucose	Acetate	3.3
<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359	B	80	Batch	Glucose	Acetate, lactate	2.4
		80	Controlled batch	Glucose/ xylose	Acetate, lactate	3.3
		85	Batch	Glucose	Acetate, lactate	3.8
		77	Batch	Glucose	Acetate, butyrate	3.2
<i>Thermotoga maritima</i> DSM 3109	B	80	Batch	Glucose	Acetate	4
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	B	70	Controlled batch	Sucrose	Acetate, lactate	3.3
		72	Controlled batch	Glucose/ xylose	Acetate, lactate	3.4
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> JCM11007	B	75	Batch	Starch	Acetate, ethanol	2.8
		75	Batch	Glucose	Acetate	4
<i>Thermococcus kodakaraensis</i> TSF100	A	85	Chemostat	Starch	Acetate, alanine	3.3
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	A		Chemostat	Maltose	Acetate, butyrate	2.9
		90	Batch	Cellobiose	Acetate, alanine	2.8
		90	Batch	Maltose	Acetate, alanine	3.5
		90	Chemostat	Maltose	Acetate, alanine	2.6
		90	Chemostat	Cellobiose	Acetate, alanine, ethanol	3.8

Tra i vari produttori di idrogeno termofili, si possono trovare differenze tra vie metaboliche di degradazione del substrato e meccanismo di smaltimento riducente. Inoltre, le differenze si possono trovare anche in merito alla posizione delle idrogenasi cellulari e alle caratteristiche enzimatiche, produttività in H<sub>2</sub> e capacità idrolitiche. Organismi modello di ordini diversi di batteri e Archaea mostrati nella Tabella 1.5.

## Thermoanaerobacteriales

Thermoanaerobacteriales è un ordine di batteri termofili appartenenti alla classe Clostridia. *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* è un organismo modello per la produzione di idrogeno appartenente a questo ordine. *C. Saccharolyticus* è un batterio termofilo non sporulante che è in grado di utilizzare una vasta gamma di substrati [43], compresi polisaccaridi complessi, quali cellulosa [44] e fanghi di carta [45] a temperature comprese tra 70 ° C e 75 ° C. La capacità di di *C. saccharolyticus* di degradazione dei legami  $\beta$  comporta  $\alpha$ -amilasi, mannanasi, cellulasi, xilanasi. Il numero di proteine totali coinvolte nel trasporto carboidrati e metabolismo nel suo genoma è 213, che è il più alto valore riportato finora per batteri termofili produttori di  $H_2$ [46]. Acido acetico, etanolo, acido lattico, oltre ad anidride carbonica e idrogeno, sono stati riportati come sottoprodotti della fermentazione. Tuttavia, la produzione di acido lattico ed etanolo è normalmente bassa, con conseguente resa di idrogeno vicino al massimo teorico di 4  $H_2$ /glucose e produttività volumetriche fino a 13,0 mmol  $H_2$ /l/h [47-49]. Durante la glicolisi via Embden-Meyerhof, *C. saccharolyticus* produce sia NADH che ferredossina ridotta (Fig. 1.24). Ossidazione di ferredossina ridotta può essere catalizzata da una idrogenasi [NiFe] transmembrana o da una idrogenasi monomerica [FeFe] citoplasmatica. *C. Saccharolyticus* sembra mancare una NADH: ferredossina ossidoreduttasi (NFO) per riossidazione NADH. Tuttavia, nel genoma del microorganismo è presente un complesso idrogenasi che mostra alta omologia a un NADH-dipendente idrogenasi trovata in *Thermoanaerobacter tengcongensis*, un produttore di idrogeno membro del genere *Thermoanaerobacteriales*, in grado di catalizzare la riduzione di protoni direttamente mediante ossidazione NADH a bassa pressione parziale di  $H_2$  (Fig. 1.23).

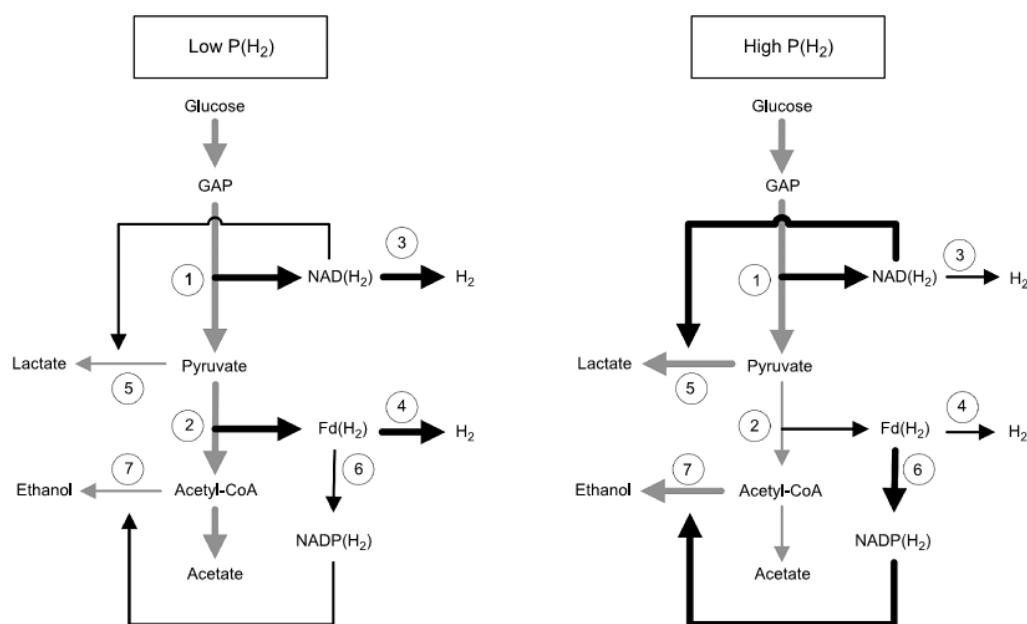


Fig. 1.24 – Schema di flusso del carbonio (frecce grigie) e flusso di elettroni (frecce nere) durante la fermentazione del glucosio *C. saccharolyticus* a bassa e ad alte pressioni di idrogeno  $P(H_2)$ . 1, glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (GAPDH); 2, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (POR); 3, NADH-dependent hydrogenase; 4, ferredoxin-dependent hydrogenase; 5, lactate dehydrogenase (LDH); 6, NADPH:ferredoxin oxidoreductase; 7, alcohol dehydrogenase & acetaldehyde dehydrogenase[18].

Effetti di inibizione da prodotto ( $H_2$  e acetato) sono stati osservati in colture di *C. saccharolyticus*. Alte pressioni di  $H_2$  sono collegate ad un aumento delle produzioni di etanolo e lattato, questo suggerisce la presenza di una NADPH:ferredossina ossidoreduttasi. Questo porta alla riduzione del NADPH che è un cofattore delle alcool deidrogenasi e acetaldeide deidrogenasi [18].

## Thermococcales

L'organismo modello appartenente all'ordine thermococcales, è *Pyrococcus furiosus*. *P. furiosus* è un organismo ipertermofilo eterotrofo zolfo riduttore con un optimum di temperature di  $90^\circ C$ . Tale microrganismo può fermentare una varietà di zuccheri e oligopolimeri contenenti amminoacidi così come idrolizzati extracellulari. Non è comunque capace di degradare cellulose e xylani[18].

*P. furiosus* ha mostrato alte rese e produttività di idrogeno. Questo potrebbe essere collegato al suo particolare metabolismo glicolitico, un Embden-Meyerhof modificato[50]. La modifica sostanziale risiede nel fatto che 8 moli di ferredossina vengono ridotte rispetto alle 4 moli di ferredossina e 2 moli di NADH (Fig 1.25). Questo è dovuto alla sostituzione di una deidrogenasi gliceraldeide 3 fosfato (GAPDH) con una ossidoreduttasi gliceraldeide 3 fosfato.

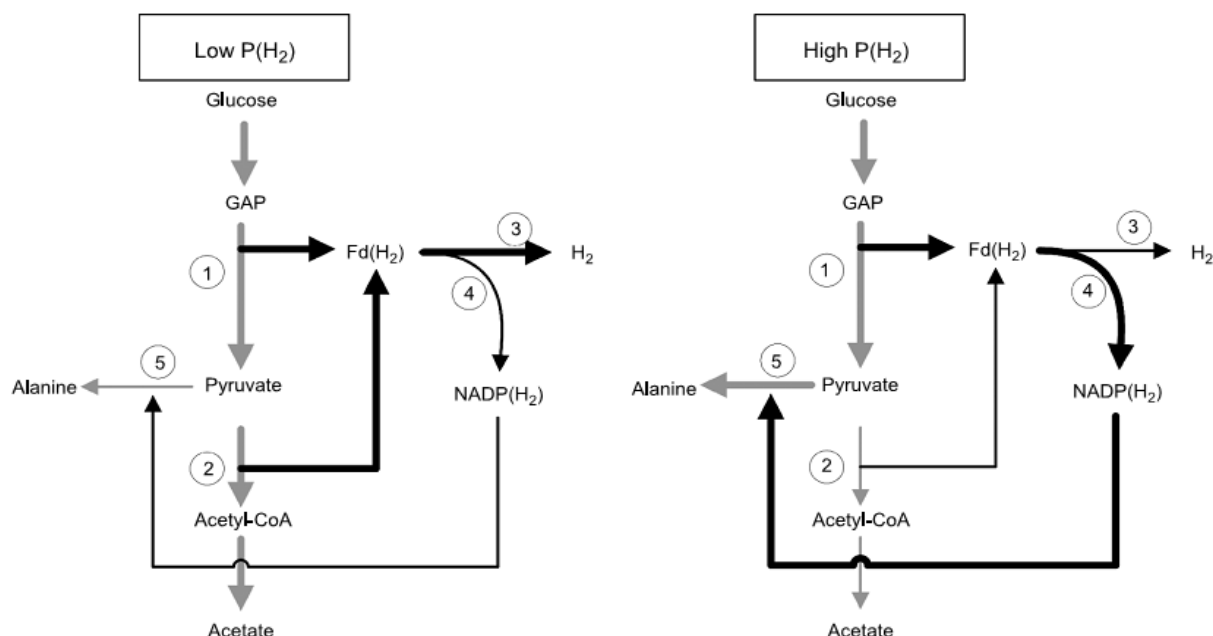


Fig. 1.25 – Schema di flusso del carbonio (freccie grigie) e flusso di elettroni (freccie nere) durante la fermentazione del glucosio *P. furiosus* a basse e ad alte pressioni di idrogeno  $P(H_2)$ . 1, glyceraldehyde-3-P:ferredoxin ossidoreduttase (GAPOR); 2, pyruvate:ferredoxin ossidoreduttase; 3, ferredoxin-dependent hydrogenase; 4, NADPH:ferredoxin ossidoreduttase; 5, glutamate dehydrogenase & alanine aminotransferase[18].

MBH è il principale responsabile per la produzione di idrogeno durante la crescita batterica attraverso la ferredossina ridotta che viene usata nella via metabolica Embden-Meyerhof. È stato dimostrato che l'ossidazione del cofattore è accoppiata con il pompaggio di elettroni all'esterno della membrana e che l'energia è conservata sotto forma di ATP attraverso una ATP sintetasi di membrana[26]. MBH è uno degli esempi di idrogenasi che catalizzano la produzione di H<sub>2</sub> in modo unidirezionale [25]. La Figura 1.25 mostra il flusso di elettroni attraverso la glicolisi, l'MBH e l'ATP sintetasi in *P. fusiosus*.

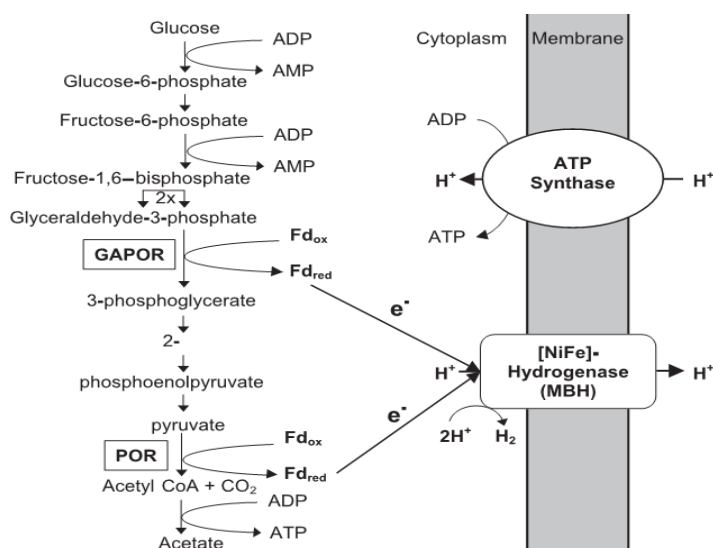


Fig 1.25 – Schema del pathway del flusso di elettroni e sintesi dell' ATP proposto per *P. furiosus* su glucosio[52].

## 1.7 IL GENERE THERMOTOGA

Il genere *Thermotogales* include un gruppo di batteri ipertermofili, di forma bastoncellare, non sporulanti aventi un particolare guaina esterna chiamata "toga" che risulta più visibile durante la fase esponenziale della crescita (figura 1.26). Nell'ordine *Thermotogales* il genere *Thermotoga* ha ricevuto particolari attenzioni per la sua versatilità metabolica dovuta al vasto range di enzimi coinvolti nell'utilizzazione di diversi substrati (numerosi monosaccaridi, oligo e polisaccaridi con legami  $\alpha$  e  $\beta$ ) e per le alte produttività in idrogeno[57]. Il genoma di sei membri del genere *thermotoga* è stato sequenziato: *Thermotoga maritima*, *T. neapolitana*, *T. petrophila*, *T. naphthophila*, *T. lettingae*, and *T. sp. RQ2*<sup>[59-61]</sup>.

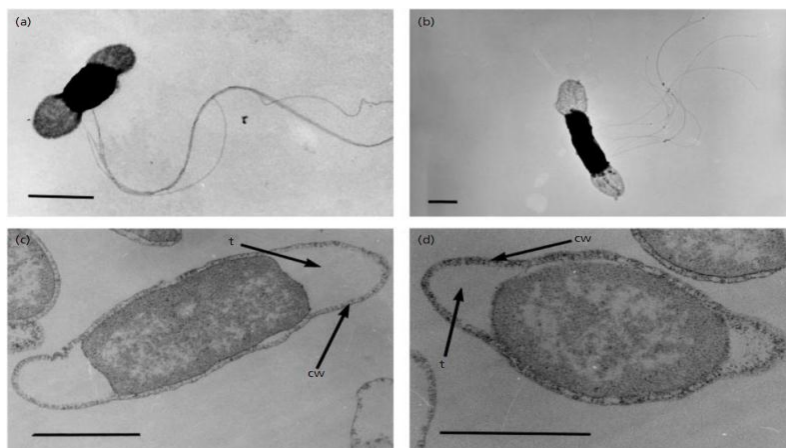


Fig. 1.26 – (a)–(b) Fotografie a scansione elettronica di *Thermotoga petrophila* (a), *Thermotoga naphthophila* (b). (c)–(d) Electron micrographs of doubly stained ultrathin sections of cells of *T. petrophila* (c) and *T. naphthophila* (d). Le frecce indicano la toga (t) e la parete cellulare (cw). Le barre corrispondono a 1  $\mu\text{m}$ [56].

## CARATTERISTICHE METABOLICHE

I batteri del *Thermotoga* si basano sul meccanismo Embden-Meyerhof, con produzione di acetato, etanolo, lattato, butirrato anidride carbonica e idrogeno<sup>[18]</sup>. In *T. neapolitana* la via EM è la via preferita per la degradazione dei carboidrati [62]. Un esempio in figura 1.27. Durante la glicolisi la trasformazione di GAP in piruvato tramite GAPDH è accoppiata alla riduzione di una mole di NADH. Il piruvato è quindi scisso in  $\text{CO}_2$  e acetyl-CoA dalla POR in concomitanza con la riduzione di altre due molecole di ferredossia[18].

Mentre a basse pressioni parziali di idrogeno il sottoprodotto principale di fermentazione è l'acetato, ad alte pressioni parziali la concentrazione di lattato aumenta a discapito delle rese in  $\text{H}_2$  [63, 64]. L'etanolo e il butirrato sono stati a volte individuate come sottoprodotti secondary della fermentazione [18 -64].

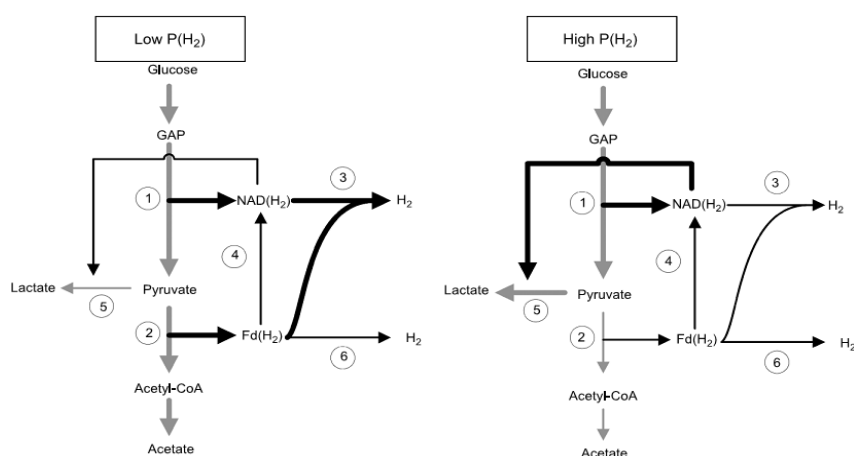


Fig. 1.27 – Schema di flusso del carbonio (frecce grigie) e flusso di elettroni (frecce nere) durante la fermentazione del glucosio *T. maritima* a basse e alte pressioni di carbonio  $P(\text{H}_2)$ . 1, glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (GAPDH); 2, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (POR); 3, bifurcating NADH/ferredoxin-dependent hydrogenase; 4, NADH:ferredoxin oxidoreductase (Nfo); 5, lactate dehydrogenase (LDH); 6, ferredoxin-dependent hydrogenase[18].

## PRODUZIONE DI IDROGENO CON IL GENERE THERMOTOGA

Tutti i membri dell'ordine *Thermotogales* mostrano la capacità di produrre idrogeno ma alcuni membri esprimono questa capacità molto meglio di altri [35, 56, 66, 67]. In particolare *T. neapolitana* riesce ad utilizzare completamente il glucosio in  $H_2$ , acetato e  $CO_2$  in rapporto 4:2:2 [68]. Fra tutti *T. neapolitana* è stato caratterizzato per la produzione di idrogeno mostrando le più alte produzione di idrogeno [35] fra i *Thermococcales* e rese vicine al limite teorico di  $4H_2$ /glucosio.

Nella tabella 1.6 vengono elencati alcuni studi sulla produzione di idrogeno per via fermentative utilizzando *T. neapolitana*. Produttività di 14.5 mmol/l/h utilizzando il glucosio e 13.1 mmol/l/h su idrolizzato di *Miscanthus* sono state raggiunte in reattori batch da 1L. *T. neapolitana* è un alofilo moderato e tollera ambienti con elevata forza ionica [48]. Considerando l'abilità a degradare diverse matrici [35, 48, 57, 67] e la capacità di resistere in diversi range di salinità possiamo considerare *T. neapolitana* come un microrganismo adatto alla produzione biologica di  $H_2$  partendo da biomasse processate e substrati ricchi di carboidrati [48,67].

**Tab. 1.6 – Condizioni di coltura batch per la produzione di idrogeno con *Thermotoga neapolitana* riportate in letteratura. (a) le rese sono riportate in mol  $H_2$  produced/mol glucose consumed; (b) questi risultati sono stati ottenuti sotto flussaggio di azoto; (c) produttività di idrogeno in mmol/l/h sono state calcolate partendo dai valori in parentesi considerando che 1 mol di un gas ideale occupa 22.4 liters di volume a 25°C.**

T	Batch volume	Buffer	Substrate	Organic acids	$H_2$ /glucose yields <sup>(a)</sup>	$H_2$ productivities	Ref.
70°C	160 ml bottles	Phosphate 4 mM TRIS 10 mM	Glucose (5.0 g/l)	-	-	0.651 mmol/l/h <sup>(c)</sup> (14.58 ml/l/h)	[69]
70°C	160 ml bottles	Phosphate 4 mM	Glucose (5.0 g/l)	-	Above 4	-	[35]
80°C	160 ml bottles	Phosphate 40 mM	Glucose (5.0 g/l)	Acetate Lactate	3.5-3.8	-	[64]
75°C	120 ml bottles	Phosphate 4 mM	Glucose (7.5 g/l)	Acetate	1.84	0.580 mmol/l/h <sup>(c)</sup> (440 ml $H_2$ /l/34h)	[70]
77°C	160 ml bottles	PIPES 20 mM	Glucose (2.5 g/l)	Acetate Lactate	3.85	0.860 mmol/l/h	[68]
80°C	2 l reactor	MOPS 50 mM	Glucose (10.0 g/l)	Acetate Lactate	3.3	14.5 mmol/l/h	[48]



80°C	2.4 l reactor	TRIS 10 mM	Glucose (5.0 g/l)	Acetate Lactate	3.85	2.27 mmol/l/h <sup>(c)</sup> (51 ml H <sub>2</sub> /l/h)	[62]
77°C	120 ml bottles	Phosphate 4 mM	Glucose (7.5 g/l)	Acetate Butyrate	3.24 <sup>(b)</sup>	0.97 mmol/l/h <sup>(c)</sup> <sup>(b)</sup> (1742ml/l/80h)	[71]
80°C	3 l reactor	Phosphate 40 mM	Glucose (7.5 g/l)	Acetate Lactate	3.8 H <sub>2</sub> /glucose	1.24 mmol/l/h	[67]

Il medium di coltura per *T. neapolitana* necessita di microelementi e vitamine ad adeguate concentrazioni[72]; un agente riducente (ad esempio la cisteina) è necessario per avere una crescita ottimale[64]. Nel medium inoltre deve essere presente anche una fonte d'azoto (ad esempio estratto di lievito, peptone o estratto di soia); la concentrazione ottimale di estratto di lievito è stata definita essere 4g/L se aggiunta come unica fonte di azoto nel caso di *T. neapolitana* mentre la dose sale a 6g/L nel caso di *T. neapolitana* [70]. È inoltre noto che l'estratto di lievito contribuisce per circa il 12-15% dell'H<sub>2</sub> prodotto in un medium in cui la principale fonte di carbonio è il glucosio[68]. La concentrazione di glucosio ottimale per colture batch in vial da 120mL è attorno ai 7.0-7.5 g/L per *T. neapolitana* e 7.0 per *T. maritima* [70].

Come descritto in precedenza la temperatura e il pH sono parametri chiave del processo e sia *T. neapolitana* che *T. maritima* hanno mostrato le migliori produzioni di H<sub>2</sub> durante esperimenti batch condotti ad una temperatura compresa fra i 75 e gli 80°C [64, 70]. Il pH iniziale ottimale in esperimenti batch è stato 7.5-8.5 per *T. neapolitana*[70] e 6.5-7.0 per *T. maritima*[70]. Va detto che l'abbondante produzione di acidi organici durante la fermentazione causa un rapido abbassamento del pH nel medium durante esperimenti batch, questo ha effetti inibitori sul metabolismo batterico [35]. L'aggiunta di basi durante la fermentazione o l'utilizzo di concentrazioni elevate di buffer hanno dimostrato di promuovere il consumo di glucosio e quindi la produzione di H<sub>2</sub> nelle colture batch[68].

Oltre agli acidi organici anche l'idrogeno ha effetti inibitori sulle capacità batteriche, in particolare nelle fermentazioni di tipo clostridico. L'accumolo di H<sub>2</sub> ha infatti effetto sulla biosintesi cellulare, innescando quindi la fase stazionaria e limitando quindi la formazione di biomassa, questo fenomeno è stato osservato in *T. maritima* [21]. Un aspetto interessante è che *T. neapolitana* risulta, da lavori precedenti, più tollerante all' H<sub>2</sub> rispetto a *T. maritima* ma la ragione di questo resta ancora da chiarire[64, 69]. È stato riportato che l'asportazione e la sostituzione del biogas presente nello spazio di testa delle vials utilizzate in esperimenti batch quando si manifesta effetto inibitorio da H<sub>2</sub> ha permesso di raggiungere rese del 78% con *T. neapolitana* [71]. In conclusione , quando si considerano sistemi batch, il rapporto fra spazio di testa e coltura liquida influenza l'accumulo di H<sub>2</sub> e la concentrazione %, quindi, può contribuire all'inibizione da H<sub>2</sub>. Nguyen et al. [71] hanno dimostrato che il miglior sistema di fermentazione batch è costituito da vials da 120mL contenenti 40mL di medium.

Van Ooteghem e colleghi sostengono che si possano ottenere rese maggiori in colture batch di *T. neapolitana* in cui sia presente O<sub>2</sub> in concentrazione del 6% nello spazio di testa [35, 69]. Questa considerazione non viene sostenuta da altri ricercatori che hanno invece dimostrato che *T. neapolitana* esposto ad atmosfere microaerofile, ne risente negativamente e le rese di produzione H<sub>2</sub> diminuiscono[64, 68].

## 2. MATERIALI E METODI

## 2.1 MICRORGANISMI E TERRENI DI COLTURA

### COMPOSTI CHIMICI E SCARTI INDUSTRIALI

I residui organici principalmente utilizzati in questo lavoro di tesi sono siero di latte e melasso da canna da zucchero, caratterizzati da un alto contenuto di carboidrati. Il melasso utilizzato in questo studio è stato prelevato dall'impianto di produzione di zucchero Trecasali, Eridania Sadam Spa (Parma, Italia); esso contiene il 24.5 % di saccarosio, il 14.0 % di fruttosio, il 9.5 % di glucosio, il 6.1 % di proteine.

In modo da mantenere costante la composizione del siero di latte per l'intera durata dello studio, è stato utilizzato siero di latte in polvere derivante da un processo di filtrazione ed essiccazione di uno scarto dell'industria casearia (Tosi & G. srl, Vimercate, Italia). I suoi componenti sono di seguito elencati: 83 % lattosio, 4 % proteine, 1 % grassi, 4 % acqua, 6 % ceneri. Tutti i composti chimici rimanenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

### CEPPI DI *THERMOTOGA* E PREPARAZIONE DELLO STOCK

Il ceppo di *Thermotoga* analizzato in questo studio per la sua abilità nel produrre idrogeno è *T. neapolitana* DSM 4359 (ATCC 49049) ottenuto dalla DSMZ (Collezione Tedesca di Microrganismi e Colture Cellulari). Le cellule liofilizzate di *T. neapolitana* sono state risospese in una versione leggermente modificata del terreno ATCC 1977. La composizione chimica e la metodica di preparazione del terreno sono descritte di seguito. Per avere uno stock della sospensione cellulare, sono state fatte crescere, in condizioni anaerobiche, delle bottiglie sterilizzate da 116 ml contenenti 40 ml di terreno fresco e inoculate al 5% v/v. Un'aliquota di 1 ml di cellule cresciute in questo modo per circa 60 ore è stata aggiunta ad 1 ml di terreno fresco sterilizzato, tamponato con HEPES ed integrato con glicerolo 40% v/v e DMSO 5% v/v. La coltura così stoccata è conservata in tubi criovial da 2 ml a -80°C.

Le colture conservate sono state generalmente utilizzate per inoculare il terreno fresco sterile (*pre-inoculo*). Il pre-inoculo cresciuto per 60 ore è stato utilizzato al 5% v/v per l'inoculo delle colture di 40 ml.

## **SOTTOPRODOTTI TESTATI COME FONTI DI CARBONIO e REAGENTI CHIMICI**

Il melasso utilizzato per i test svolti proviene dall'impianto Trecasali di proprietà Eridania Spa (San Quirico, Parma, Italia). La sua composizione in peso, determinata con analisi svolte in dipartimento è stata 24.5% saccarosio, 14.0% fruttosio, 9.5% glucosio.

Il siero di latte proviene invece dalla ditta Tosi & C. Srl (Vimercate, Monza, Italia). Al fine di conservare facilmente il sottoprodotto e di svolgere test con una matrice stabile il suddetto siero di latte è stato filtrato e liofilizzato all'origine ed è quindi stato impiegato in polvere. Tale matrice ha la seguente composizione dichiarata dal produttore: 83% lattosio, 5% proteine, 1% grassi, 7% ceneri, 4% umidità.

Tutti i rimanenti prodotti chimici impiegati per i test sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

## **COMPOSIZIONE DEL TERRENO E CRESCITA DELLA COLTURA**

La composizione chimica dei terreni di crescita è riassunta nelle tabelle 2.1, 2.2, 2.3. La versione modificata del terreno è stata integrata con sali di cloruro che sostituiscono i sali di solfuro e di solfato, accettori di elettroni alternativi allo ione idrogeno ( $H^+$ ). Quando richiesto, il siero di latte o il melasso hanno sostituito il glucosio rispettivamente alle concentrazioni di 12.5 e 20 g/l; il tampone, HEPES, è stato fornito alla concentrazione di 23.8 g/l (100 mM).

*T. neapolitana* è stato coltivato sulla versione modificata del terreno ATCC1977 (modATCC1977).

Il pH iniziale del terreno è 8.5, la resazurina è aggiunta dopo aver regolato il pH. Il terreno è stato preparato in atmosfera aerobica, le bottiglie da 116 ml (Figura 2.1) sono state riempite quindi con 40 ml di terreno, successivamente sigillate con tappi di gomma di butile e fissati con ghiere metalliche. Nelle bottiglie sigillate, contenenti il terreno di coltura, è stato gorgogliato  $N_2$  attraverso degli aghi sterili: l'operazione termina quando la colorazione viola data dalla resazurina (indicatore della presenza di ossigeno) vira al trasparente. Una volta inoculate, le bottiglie sono state poste in un incubatore Dubnoff provvisto di shaker, a 100 rpm, a 77 °C. La figura 3.1 illustra l'aspetto delle colture batch.



**Fig. 2.1 – Colture batch sterili pronte per l'utilizzo. Da sinistra, modATCC1977 rispettivamente con glucosio, siero di latte e melasso.**

**Tab. 2.1 – Modified ATCC 1977 (modATCC 1977) medium chemical composition**

<b>NaCl</b>	10.0 g/l
<b>CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O</b>	0.3 g/l
<b>MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O</b>	0.2 g/l
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	1.0 g/l
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.3 g/l
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.3 g/l
<b>KCl</b>	0.1 g/l
<b>YE</b>	2.0 g/l
<b>TSB</b>	2.0 g/l
<b>Vitamin solution (DSM 143)</b>	10.0 ml/l
<b>Microelement solution (DSM 143)</b>	10.0 ml/l
<b>Glucose</b>	7.5 g/l
<b>Resazurine</b>	20.0 mg/l
<b>L-Cysteine · HCl</b>	1.0 g/l

**Tab. 2.2 – Modified DSM 1232 medium chemical composition**

NaCl	26.0 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	0.5 g/l
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1.4 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.7 g/l
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.6 g/l
Yeast extract (YE)	2.0 g/l
Tryptic soy broth (TSB)	2.0 g/l
Microelement solution (DSM 141)	10.0 ml/l
Vitamin solution (DSM 141)	10.0 ml/l
Glucose	7.5 g/l
Resazurin	20 mg/l
L-Cysteine · HCl	0.5 g/l

**Tab. 2.3 – Modified DSM 913 medium chemical composition**

NaCl	20.0 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g/l
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	3.0 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g/l
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.3 g/l
Yeast extract (YE)	2.0 g/l
Microelement solution (DSM 141)	10.0 ml/l
Vitamin solution (DSM 141)	10.0 ml/l
Glucose	7.5 g/l
Resazurin	20 mg/l
L-Cysteine · HCl	0.3 g/l

La composizione delle soluzioni di microelementi e vitamine è mostrata nelle tabelle 2.4 e 2.5.

**Tab. 2.4 – Microelement solution DSM 141**

Nitrilotriacetic acid	1500 mg/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	3000 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	500 mg/l
NaCl	1000 mg/l
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	100 mg/l
CoSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	180 mg/l
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	100 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	180 mg/l
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * 12 H <sub>2</sub> O	20 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
NiCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	25 mg/l
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0.3 mg/l

**Tab. 2.5 – Vitamin solution DSM 141**

Biotine	2 mg/l
Folic acid	2 mg/l
Piridossine HCl	10 mg/l
Tiamine HCl	5 mg/l
Riboflavine	5 mg/l
Nicotinic acid	5 mg/l
D-Ca-pantotenate	5 mg/l
Cobalamin (Vitamin B12)	0,1 mg/l
p-aminobenzoic acid	5 mg/l
Lipoic acid	5 mg/l

Un terreno di controllo non inoculato, preparato in condizioni non sterili, è stato incubato a 77°C, temperatura di crescita delle specie di *Thermotoga*: non è stata rilevata produzione di



idrogeno e, dalle osservazioni al microscopio ottico, non è stata riscontrata crescita cellulare. Secondo quanto osservato, non si è più proceduto con la sterilizzazione: l'intera gamma di esperimenti riportati sono stati quindi effettuati in condizioni non sterili, se non altrimenti specificato. Nelle metodiche in cui si è rivelata necessaria la sterilità, le bottiglie ed il mezzo di coltura sono stati autoclavati a 121°C per 20 minuti. Le soluzioni filtrate di microelementi, vitamine, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> e glucosio sono state aggiunte successivamente al terreno completo.

## 2.2 PROVE CON BIOMASSA SOSPESA

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato; ogni bottiglia conteneva 38 ml di terreno liquido e 2 ml di inoculo. I microcosmi sono stati seguiti per 7 giorni; per l'intero periodo dell'esperimento, una o due volte al giorno sono state effettuate le analisi dei gas, prelevando inoltre dei campioni iniziali e finali per la quantificazione della biomassa e della composizione chimica del mezzo.

## 2.3. SELEZIONE DEL BUFFER

La lista di buffers testati in base alla loro capacità di mantenere valori fisiologici di pH durante la crescita di *T. neapolitana* e conservare così le condizioni migliori per la produzione di idrogeno sono presentati in tabella 2.6.

**Table 2.6 – Buffers testate nelle prove di produzione di idrogeno con *T. neapolitana* su modATCC 1977 medium.**

BUFFER	OPTIMAL pH	INITIAL Ph
Diacid/Monoacid Phosphate ( $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ )	6.8	8.5
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (TRIS)	7.5 - 7.9 (8.5)	8.5
3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS)	6.5 - 7.9 (7.2)	8.5
Piperazine-N, N'-bis(2-ethanesulfonic) acid (PIPES)	6.5 – 7.8 (6.8)	8.5
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	6.8 – 8.2 (7.5)	8.5

Le prove sono state condotte sino al momento in cui non fosse osservabile una ulteriore produzione di idrogeno; questo solitamente accadeva dopo 68-72 h nel medium modATCC 1977 utilizzando glucosio come fonte principale di carbonio. Il valore iniziale di pH a temperatura ambiente era 8.5 essendo il valore più alto nel range ottimale di produzione di idrogeno con *T. neapolitana* in colture batch.

## 2.4 SELEZIONE DEI CEPPI DI *THERMOTOGA*

Sono stati confrontati 4 ceppi di *Thermotoga*: *T. neapolitana* DSM 4359 (ATCC 49049), *T. maritima* DSM 3109, *T. naphthophila* DSM 13996 and *T. petrophila* DSM 13995. Tutte le prove sono state condotte in vials in vetro da 116mL, sigillate con setti in gomma e messe ad incubare a 77°C e con agitazione di 100rpm nell'agitatore orbitale Dubnoff (General Laboratory Supply, Pasadena USA), pH iniziale 8.5.

Prima dell'aggiunta dell'inoculo ogni vial con terreno fresco è stata flussata con N<sub>2</sub> fino a che l'indicatore resazurina risultava incolore. Ogni vial conteneva 38mL di terreno di coltura e 2mL di inoculo. Queste prove sono state monitorate per 7 giorni con misurazioni giornaliere del volume di biogas prodotto e della sua composizione.

La concentrazione dei prodotti di fermentazione (acidi organici) gli zuccheri residui e la concentrazione cellulare sono state valutate prelevando campioni al momento iniziale e al momento finale della prova. Prima di ogni campionamento la pressione veniva regolata ad 1atm mediante una siringa di vetro.

## 2.5 LA MINIMIZZAZIONE DEL MEDIUM DI COLTURA

Il medium modATCC 1977 per *T. neapolitana* è composto da soluzioni di microelementi, vitamine, agente riducente e altri costosi componenti i quali rendono poco fattibile la produzione di idrogeno su larga scala anche per la difficoltà nella preparazione del terreno di coltura stesso. Al fine di ridurre il costo e semplificarne la preparazione è stato condotto uno studio volto a ridurre la varietà dei componenti utilizzati e alla sostituzione del glucosio con altre fonti di carbonio quali il melasso e il siero di latte. Il principio della minimizzazione è stato quello di ridurre i componenti senza intaccare le produzioni di idrogeno.

L'ottimizzazione del terreno è avvenuta passo dopo passo considerando ogni elemento principale del terreno. Sono stati valutati; microelementi, vitamine, TSB, YE, cisteina ed altri.

Un agente riducente è stato testato in sostituzione della cisteina: il matabisolfito (MBS)

I macroelementi come NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sono stati considerati indispensabili per l'equilibrio osmotico e per il contributo in azoto e fosforo. KCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub> sono stati inclusi nella lista dei microelementi. I test per ogni configurazione del terreno sono stati condotti per la durata di una settimana. Le tabelle 2.7 e 2.8 mostrano le strategie di minimizzazione adottate con modATCC 1977 utilizzando melasso come fonte di carbonio- Le tabelle 2.9 e 2.10 mostrano invece la minimizzazione condotta con siero di latte in sostituzione al glucosio.

**Table 2.7 – Test di minimizzazione del terreno di coltura per *T. neapolitana* modATCC 1977 su melasso e cisteina come agente riducente**

Test	HEPES g/L	NaCl g/L	H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub> g/L	NH <sub>4</sub> Cl g/L	TSB g/L	YE g/L	KCl g/L	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O g/L	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O g/L	Cys g/L	Vitamins mL/ L	µelement mL/L
1	23.8	10	0.7	1	2	2	0.1	0.1	0.2	1	10	10
2	23.8	10	0.7	1	2	0	0.1	0.1	0.2	1	10	10
3	23.8	10	0.7	1	0	2	0.1	0.1	0.2	1	10	10
4	23.8	10	0.7	1	2	2	0.1	0.1	0.2	1	10	0
5	23.8	10	0.7	1	2	2	0.1	0.1	0.2	1	0	10
6	23.8	10	0.7	1	2	2	0.1	0.1	0.2	0	10	10
7	23.8	10	0.7	1	0	0	0	0	0	1	0	0
8	23.8	10	0.7	5	0	0	0	0	0	1	0	0
9	23.8	10	0.7	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	23.8	10	0.7	1	0	0	0	0	0	0.5	0	0

**Table 2.8 – Test di minimizzazione del terreno di coltura per *T. neapolitana* modATCC 1977 con melasso e MBS come agente riducente**

Test	HEPES g/L	NaCl g/L	H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub> g/L	NH <sub>4</sub> Cl g/L	TSB g/L	YE g/L	KCl g/L	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O g/L	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O g/L	MBS g/L	Vitamins mL/ L	µelement mL/L
1	23.8	10	0.7	1	0	0	0	0	0	0.5	0	0
2	23.8	10	0.7	1	0	0	0	0	0	0.25	0	0
3	23.8	10	0.7	1	0	0	0	0	0	0.125	0	0
4	23.8	10	0.7	1	0	0	0	0	0	0.0625	0	0

**Table 2.9 – Test di minimizzazione del terreno di coltura per *T. neapolitana* modATCC 1977 con siero di latte e cisteina come agente riducente**

Test	HEPES g/L	NaCl g/L	H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub> g/L	NH <sub>4</sub> Cl g/L	TSB g/L	YE g/L	KCl g/L	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O g/L	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O g/L	Cys g/L	Vitamins mL/ L	µelement mL/L
1	23.8	10	0.7	1	2	2	0.1	0.1	0.2	1	10	10
2	23.8	10	0.7	1	2	2	0.1	0.1	0.2	1	10	0
3	23.8	10	0.7	1	0	2	0.1	0.1	0.2	1	10	10
4	23.8	10	0.7	1	2	2	0.1	0.1	0.2	1	0	10

5	23.8	10	0.7	1	2	0	0.1	0.1	0.2	1	10	10
6	23.8	10	0.7	1	2	0	0.1	0.1	0.2	1	0	10
7	23.8	10	0.7	1	0	0	0.1	0.1	0.2	1	0	10
8	23.8	10	0.7	5	2	0	0	0	0	1	0	0
9	23.8	10	0.7	1	2	0	0.1	0.1	0.2	0	0	0
10	23.8	10	0.7	1	2	0	0.1	0.1	0.2	1	0	0
11	23.8	10	0.7	1	0	0	0	0	0	1	10	0
12	23.8	10	0.7	1	0	2	0	0	0	1	0	0
13	23.8	10	0.7	1	2	0	0	0	0	1	0	0
14	23.8	10	0.7	1	1	1	0.1	0.1	0.2	1	0	0
15	23.8	10	0.7	1	2	0	0.1	0.1	0.2	1	0	0
16	23.8	10	0.7	1	0	2	0.1	0.1	0.2	1	0	0

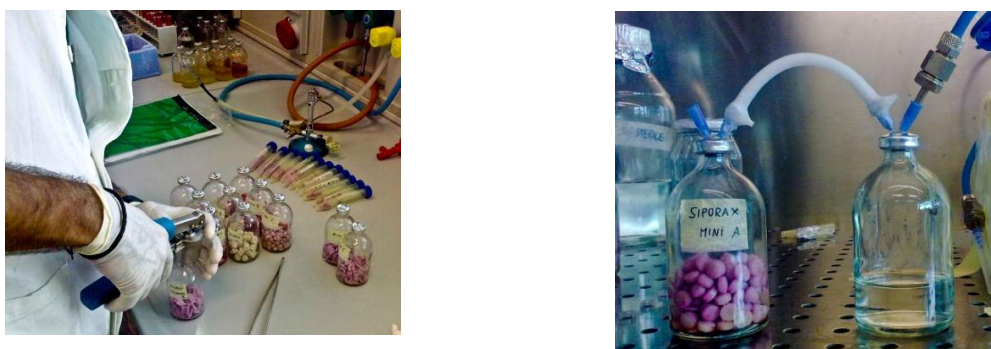
**Table 2.10 – Test di minimizzazione del terreno di coltura per *T. neapolitana* modATCC 1977 con siero di latte e MBS come agente riducente**

Test	HEPES g/L	NaCl g/L	H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub> g/L	NH <sub>4</sub> Cl g/L	TSB g/L	YE g/L	KCl g/L	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O g/L	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O g/L	MBS g/L	Vitamins mL/ L	µelement mL/L
1	23.8	10	0.7	1	2	0	0	0	0	0.5	0	0
2	23.8	10	0.7	1	2	0	0	0	0	0.25	0	0
3	23.8	10	0.7	1	2	0	0	0	0	0.125	0	0
4	23.8	10	0.7	1	2	0	0	0	0	0.0625	0	0

## 2.6 PROVE CON BIOMASSA ADESA

Nelle prove con le cellule immobilizzate, ogni bottiglia è stata riempita con 38 ml di terreno liquido, 2 ml di inoculo e 11 ml di supporti porosi. La preparazione del terreno è stata eseguita come precedentemente descritto; tutti gli esperimenti con le cellule adese sono stati eseguiti in condizioni non sterili. L'analisi della produzione di idrogeno da cellule adese è stata divisa in due stadi, in modo da minimizzare l'interferenza dovuta alle cellule cresciute in sospensione. Il primo stadio è consistito nell'inoculo delle colture batch e nella crescita mista del biofilm microbico sui supporti solidi e delle cellule in sospensione. Dopo 64 ore, il terreno liquido veniva rimosso ed i supporti lavati due volte con 40 ml di soluzione fisiologica. Il doppio lavaggio con soluzione salina è volto a rimuovere le cellule semi-immobilizzate e le cellule sospese nel mezzo di coltura contenuto nei pori dei supporti. Nel secondo stadio, le bottiglie contenenti i supporti sono state sigillate,





flussate con azoto in modo da eliminare ogni traccia di ossigeno e, utilizzando un sistema di aghi, sono stati aggiunti 40 ml di terreno fresco (Fig. 2.2). Le bottiglie sono state quindi poste in agitazione a 100 rpm, a 77°C e seguite nella produzione di idrogeno per le 3-5 ore successive all'incubazione. Gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato. La quantificazione dei gas prodotti è stata effettuata ogni ora. La composizione degli acidi grassi e dei carboidrati è stata analizzata per ogni coltura ed ogni triplicato, attraverso il prelievo di un campione di terreno all'inizio, alla fine e per ogni ora della prova. La biomassa finale è stata quantificata su tutti i supporti presenti nelle singole bottiglie, la procedura utilizzata sarà descritta successivamente.



**Fig. 2.2 – A sinistra le bottiglie vengono sigillate con tappi in butile e ghiera metalliche; a destra un sistema ad aghi permette il trasporto del terreno tra microcosmi sigillati in atmosfera di N<sub>2</sub>. Il tubo del sistema possiede 1 ago ad ogni estremità. La bottiglia contenente il terreno in atmosfera di N<sub>2</sub> viene capovolta: un ago pesca il terreno, un secondo ago all'altra estremità del tubo ripone il terreno nel microcosmo con i supporti al cui tappo è applicato un ulteriore ago di sfiato.**

## 2.7 SUPPORTI POROSI E TEST DI ADESIONE CELLULARE

I supporti confrontati nei test di formazione del biofilm da *T. neapolitana* sono indicati nella Tab. 2.11, in cui sono elencate le caratteristiche fisiche di ogni supporto. *T. neapolitana* è stato fatto crescere nel terreno ATCC1977 arricchito con glucosio come fonte di carbonio ed il test è stato eseguito come precedentemente descritto. Nella scelta del miglior supporto su cui far crescere *T. neapolitana* è stata presa in considerazione anche l'area superficiale specifica di ognuno ( $\text{m}^2/\text{ml}$  reattore impaccato).

	<b>Syporax® cilindri</b> <hr/> Porosità: 82% <hr/> Densità: 0.370 kg/l <hr/> Materiale: Vetro sinterizzato		<b>Biomax</b> <hr/> Porosità: 67% <hr/> Densità: 0.777 kg/l <hr/> Materiale: Ceramica
	<b>Syporax® mini</b> <hr/> Porosità: 70% <hr/> Densità: 0.535 kg/l <hr/> Materiale: Vetro sinterizzato		<b>Glaxstone</b> <hr/> Porosità: 75% <hr/> Densità: 0.593 kg/l <hr/> Materiale: Vetro sinterizzato

**Tab. 2.11 – Caratteristiche dei supporti porosi.**

L'area superficiale specifica dei supporti è stata misurata con un Micromeritics ASAP (2020) attraverso l'assorbimento/desorbimento di azoto a  $-196^\circ\text{C}$ . La procedura prevede come primo passaggio la degassificazione sottovuoto, poi il riscaldamento sino a  $250^\circ\text{C}$  e mantenimento per 30 minuti ad una pressione inferiore a  $30 \text{ } \mu\text{mHg}$ . L'area specifica superficiale è stata calcolata con il metodo Brunauer-Emmett-Teller (BET).

## 2.8 INIBIZIONE DA OSSIGENO

I ceppi di *Thermotoga* sono ovviamente anaerobici, questo significa che sono intolleranti alla presenza di Ossigeno. A seguito di ciò è stato ritenuto interessante condurre uno studio volto a valutare i limiti di tolleranza di *Thermotoga* all'ossigeno. Lo studio è stato condotto solo su siero di latte in condizioni di biomassa sospesa e adesa.

Dopo la crescita della biomassa sono state aggiunte diverse concentrazioni di ossigeno nello spazio di testa delle vials da 116mL. Nel caso dei test svolti su biomassa sospesa le concentrazioni testate sono state 0.1, 0.5 e 1%; nei test a biomassa adesa invece le concentrazioni testate sono state 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 e 1%. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato e sia nel test a biomassa adesa che in quello a biomassa sospesa sono stati pianificati i controlli negativi.

## 2.9 INIBIZIONE DA IDROGENO

Per valutare se il metabolismo di *T. neapolitana* fosse interessato da un fenomeno di inibizione da prodotto è stato condotto un apposito studio condotto utilizzando tutti i substrati valutati in questo dottorato sia con biomassa sospesa che con biomassa adesa. La crescita della biomassa è stata eseguita come già descritto.

Nel test a biomassa sospesa il primo step è stato quello di far crescere la biomassa sino al termine della fonte di carbonio presente nel medium. Dopo il consumo completo degli zuccheri è stato aggiunto ad ogni vial un volume pari a 5mL di terreno concentrato a fine di riportarne la concentrazione a livelli iniziali, lo spazio di testa è stato flussato con azoto e le quantità di H<sub>2</sub> sono state introdotte nello spazio di testa.

Nei test a biomassa adesa invece il primo step è stata la crescita della biomassa sui supporti e la formazione quindi di un biofilm. Dopo 64h di crescita le vials sono state aperte e i supporti lavati con 40mL di soluzione salina un paio di volte. Nel secondo passaggio 40mL di terreno fresco sono stati aggiunti alle bottiglie, sono state ripristinate le condizioni di anaerobiosi e nello spazio di testa sono state aggiunte le concentrazioni di H<sub>2</sub> sopra riportate.

La produzione di idrogeno è stata monitorata nelle seguenti 3 – 5 h dall'introduzione delle concentrazioni stabilite di idrogeno. Nella tabella 2.12 è riportato lo schema del test.

**Table 2.12 – Schema per i test d'inibizione da idrogeno**

<b>Substrate</b>	<b>Culture Medium</b>	<b>Biomass</b>	<b>H<sub>2</sub> %</b>
<b>GLUCOSE 7.5 g/L</b>	<b>Medium Minimum</b>	<b>Immobilized</b>	0.73
			13
			25
			37
			47
			56
<b>GLUCOSE 7.5 g/L</b>	<b>Medium Minimum</b>	<b>Suspended</b>	0.35
			10
			18
			30
			40
			50
<b>MOLASSES 20 g/L</b>	<b>Medium Minimum</b>	<b>Immobilized</b>	2
			10
			18
			29
			37
<b>MOLASSES 20 g/L</b>	<b>Medium Minimum</b>	<b>Suspended</b>	0
			6
			16
			29
			45
			58
<b>CHEESES WHEY 12.5 g/L</b>	<b>Medium Minimum</b>	<b>Immobilized</b>	0.73
			13
			25
			37
			56
<b>CHEESES WHEY 12.5 g/L</b>	<b>Medium Minimum</b>	<b>Suspended</b>	0.39
			13
			25
			38



## 2.10 INIBIZIONE DA SUBSTRATO

Questo test è volto a valutare quale range di concentrazione de substrato zuccherino è ottimale per la produzione di idrogeno da parte di *T. neapolitana*. Il test di inibizione quindi è stato condotto su tutti i substrati in esame e utilizzando sia biomassa sospesa che biomassa adesa.

I calcoli dei parametri cinetici sono stati svolti utilizzando Microsoft Excel 2003. Il modello utilizzato è stato il modello Haldane:

$$q_{H_2} = \frac{q_{\max, H_2} \cdot S}{K_S + S + S^2 / K_I}$$

La velocità specifica di produzione d'idrogeno ( $q_{H_2}$ ) è stata assunta essere proporzionale alla velocità di consumo del substrato.  $S$  è la concentrazione del substrato,  $K_S$  è la costante di utilizzo del substrato,  $K_I$  è la costante di inibizione del substrato e  $q_{\max, H_2}$  è la massima velocità specifica di produzione idrogeno.

Un primo set di possibili valori per ogni costante è stato proposto al software di calcolo in modo da calcolare la velocità specifica di produzione d'idrogeno da parte di ogni substrato.

Impiegando i valori così calcolati è stata ottenuta una deviazione standard quadratica per ogni condizione sperimentale e quindi attraverso un metodo di test degli errori, lo scarto è stato minimizzato.

Le condizioni dei diversi test di inibizione da idrogeno sono riportate in tabella 2.13.

Tabella 2.13 – Schema inibizione da substrato.

Substrate	Culture Medium	Biomass	Sugars g/L
GLUCOSE	Medium Minimum	Immobilized	0.25
			0.5
			0.7
			0.8
			17
			48
			95
GLUCOSE	Medium Minimum	Suspended	0.36
			0.65
			0.89
			1.5
			6
			18
			36
MOLASSES	Medium Minimum	Immobilized	51
			0.27
			0.6
			0.7
			1.5
			5
			7
MOLASSES	Medium Minimum	Suspended	13
			33
			0.10
			0.3
			0.4
			2.5
			6
CHEESES WHEY	Medium Minimum	Immobilized	12
			31
			0.32
			0.45
			0.6

			0.8
			3.6
			17
			36
			72
CHEESES WHEY	Medium Minimum	Suspended	0.42
			0.6
			0.7
			0.9
			3
			12
			32
			60

## 2.11 METODO DI QUANTIFICAZIONE DELLA BIOMASSA

### ANALISI DEL CONTENUTO PROTEICO NELLA BIOMASSA

Per esaminare il contenuto proteico cellulare si è utilizzato il metodo di Lowry. La lista delle soluzioni usate è descritta in Tabella 2.14.

<b>Soluzione A</b>	2% of $\text{Na}_2\text{CO}_3$ in NaOH 0.1 N
<b>Soluzione B1</b>	1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in acqua distillata
<b>Soluzione B2</b>	2% Na-tartrato in $\text{H}_2\text{O}$ distillata
<b>Soluzione C</b>	Soluzioni A: B1: B2 in un rapporto 100:1:1
<b>Soluzione E</b>	Folin-Ciocalteu reattivo 2N diluito in $\text{H}_2\text{O}$ distillata

Tab. 2.14 – Soluzioni utilizzate per la quantificazione proteica con il metodo di Lowry.

La curva di calibrazione è stata preparata partendo da campioni di albumina di siero bovino (BSA) a diverse concentrazioni. Le soluzioni stock 1 mg/ml di BSA sono state conservate in aliquote da 1 ml a -20°C pronte per l'uso. I campioni standard di BSA per la curva di calibrazione sono stati preparati in duplicato; le concentrazioni utilizzate sono riportate in tabella (Tab. 2.15).

H <sub>2</sub> O (μL)	BSA (μL)	[BSA] (mg/L)
500.0	0.0	0
468.0	32.5	10
435.0	65.0	20
402.5	97.5	30
337.5	162.5	50

**Tab. 2.15 – Concentrazioni standard di BSA. Le concentrazioni [BSA] nella colonna a destra sono le concentrazioni finali, al termine della procedura (3.25 ml di volume).**

I campioni di coltura cellulare di 1 ml sono stati centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato lavato due volte con lo stesso volume di soluzione salina di NaCl 10 g/L, centrifugato per 10 minuti a 13000 rpm e risospeso in soluzione salina. A questo punto, una sospensione cellulare di 50-300 μl è stata aggiunta a 100 μl di NaOH 0.5 N, infine si è aggiunta H<sub>2</sub>O per raggiungere un volume finale di 500 μl. Generalmente sono stati utilizzati 200 μl di coltura di *T. neapolitana* cresciuta per 48-72 h.

Il metodo di Lowry realizzato nelle analisi del contenuto proteico è descritto di seguito. Solo i campioni proteici sono stati fatti bollire per 1 minuto in acqua distillata e posti in ghiaccio subito dopo. Agli standard e ai campioni proteici sono stati aggiunti 2,5 ml di soluzione C, immediatamente miscelati tramite vortex. Gli standard ed i campioni proteici sono stati incubati per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente ai campioni e agli standard sono stati aggiunti 250 μl di soluzione e posti in incubazione a temperatura ambiente per 30 minuti. I campioni sono stati analizzati allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 540 nm. Per risalire alla concentrazione proteica, i dati di assorbanza dei campioni sono stati interpolati con la curva di calibrazione, considerando i fattori di diluizione o di concentrazione.

## QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE IMMOBILIZZATE

La concentrazione delle cellule immobilizzate è stata determinata seguendo la procedura qui descritta. Al termine delle prove a biomassa adesa, i 40 ml di terreno sono stati eliminati, i supporti recuperati in falcon da 50 ml in cui sono stati aggiunti 30 ml di acqua deionizzata, in modo da rimuovere le cellule sospese. Le falcon sono state incubate per 18 ore a 100 rpm e 77 °C, per ottenere una prima separazione del biofilm e permettere al terreno di crescita residuo, rimasto nei pori dei supporti, di diluirsi con l'acqua deionizzata addizionata. Dopo il primo lavaggio, i supporti sono stati centrifugati per 10 minuti a 8000 rpm e il surnatante che porta con sé il mezzo di crescita residuo è stato rimosso. Sono stati nuovamente aggiunti 30 ml di acqua deionizzata alle falcon, incubate ancora per un'ora a 77 °C, a 100 rpm; si è proceduto con un secondo stadio di centrifuga (10 minuti, 8000 rpm) e rimozione del surnatante. Le falcon contenenti i supporti sono state riempite con 30 ml di NaOH 1 M e riposte nell'incubatore a 100 rpm per 1 ora, a 77 °C. Quest'operazione ha permesso all'idrossido di sodio di entrare nei pori dei supporti e reagire sia con le cellule del biofilm residuo che con le cellule ormai sospese dai due precedenti stadi di distacco della biomassa. A questo punto è stato applicato il tradizionale metodo di Lowry. Questa procedura è stata applicata alla fine di ogni esperimento alla biomassa adesa a tutti i supporti di ogni bottiglia in modo da ottenere un'alta riproducibilità delle misure di concentrazione delle cellule cresciute sui supporti nei vari replicati (deviazione standard = 5%). Malgrado i due lavaggi dei supporti con acqua deionizzata, l'applicazione della procedura appena descritta a campioni di controllo abiotici, contenenti 11 ml di supporti in 40 ml di terreno di crescita non inoculato, è risultato in valori di concentrazione proteica non trascurabili. La massa proteica ottenuta dai test abiotici di controllo per ogni fonte di carbonio (glucosio, melasso o siero di latte) è stata sottratta alla massa proteica totale misurata nei test corrispondenti, in modo da non trascurare il contributo alla misura delle proteine dato dai componenti del terreno che interferiscono con il metodo di Lowry. In modo da quantificare la concentrazione netta delle cellule realmente adese ( $\text{mg}_{\text{proteine}} / \text{litro impaccato}$ ), la massa proteica risultante è stata divisa per il volume totale occupato dai supporti (volume dei supporti inclusa la porosità interna + il volume dello spazio interstiziale).

## 2.12 ANALISI CHIMICHE

Le metodiche di analisi della composizione chimica e di rilevamento dei biogas prodotti sono descritte di seguito. I volumi considerati nell'analisi dei dati degli esperimenti con cellule sospese sono 40 ml di fase liquida e 76 ml di spazio di testa. I volumi considerati nell'analisi dei dati degli esperimenti a biomassa adesa sono 11 ml di fase solida, 40 ml di fase liquida e 65 ml di spazio di testa.

### BIOGAS

Il biogas prodotto dalle colture batch è stato misurato periodicamente. La composizione dell'idrogeno e del diossido di carbonio nello spazio di testa è stata analizzata usando un micro gas cromatografo Agilent 3000 ( $\mu$ -GC) collegato ad un detector a conduttività termica (TCD). Il metodo strumentale è descritto in tabella 2.16.

<b>Temperatura Pre-colonna</b>	90°C
<b>Temperatura colonna</b>	60°C
<b>Pressione</b>	25 psi
<b>Gas di trasporto</b>	Azoto
<b>Tempo di campionatura</b>	20 s
<b>Tempo di iniezione</b>	50 msec
<b>Durata dell'analisi</b>	44 s

**Tab. 2.16 –  $\mu$ -GC parametri analitici.**

La calibrazione dell'idrogeno e dell'anidride carbonica è stata effettuata in triplicato con bottiglie da 116 ml chiuse ermeticamente. Le concentrazioni standard analizzate per la taratura sono rispettivamente 1%, 10%, 20%, 30% e 50% per l'idrogeno e 1%, 5%, 10% e 30% per l'anidride carbonica. Il campionamento delle colture batch a 77°C è stato eseguito attraverso l'inserimento di un ago direttamente collegato al  $\mu$ -GC nel tappo di butile. Il volume dello spazio di testa

campionato dallo strumento è di 2 ml. Il volume di biogas prodotto è preliminarmente misurato con siringhe di vetro di 5-100 ml, 2 ml di gas sono reintrodotti nello spazio di testa in modo da riportare il valore di pressione a quella atmosferica dopo ogni analisi. La produzione di idrogeno e di anidride carbonica è stata calcolata considerando sia i volumi che le concentrazioni dei gas nello spazio di testa. Per ottenere una stima precisa, si tiene conto anche dei gas disciolti nella fase liquida alla temperatura di 77°C.

Il biogas prodotto nel reattore è stato misurato periodicamente. Idrogeno, anidride carbonica sono state analizzate utilizzando un gascromatografo (GC) HP 5890 con detector a conducibilità termica (TCD). Il metodo è riportato in tabella 2.17.

**Tab. 2.17. – GC analysis parameters**

<b>Column temperature</b>	35 -80°C
<b>Pressure</b>	7 psi
<b>Gas carrier</b>	Nitrogen
<b>Time of analysis</b>	17 min

Le calibrazioni sono state fatte in triplicate utilizzando vial da 116mL con concentrazioni note degli analiti. Le concentrazioni di idrogeno per la retta di taratura sono state 1, 10, 20, 30, 40 and 70%. Per l'anidride carbonica 1, 5, 10, 20 and 30%. I volumi di 200uL del biogas prelevato dallo spazio di testa del reattore è stato iniettato in modalità splitless utilizzando una siringa di vetro da 500uL con stantuffo in teflon.

## ACIDI GRASSI, CARBOIDRATI E RESE

La concentrazione degli acidi organici e dei mono- e disaccaridi presenti nei substrati organici e nel terreno è stata valutata attraverso cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). Campioni da 1 ml sono stati prelevati da ogni coltura e centrifugati per 10 minuti a 13000 rpm. Il surnatante è stato filtrato con filtri da 0.22  $\mu\text{m}$ . La metodica dell'HPLC è riassunta in tabella 2.18. Il loop dell'HPLC è stato lavato con 80  $\mu\text{m}$  di campione prima di ogni iniezione.

<b>Temperatura</b>	85°C
<b>Detector</b>	Indice di rifrazione (Shimadzu RID-10A)
<b>Colonna</b>	Coregel 87H, Transgenomic
<b>Pre-colonna</b>	Coregel 87H, Transgenomic
<b>Fase Mobile</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Flusso Fase Mob.</b>	0.6 ml/min
<b>Pressione</b>	55-62 kg/cm <sup>2</sup>

**Tab. 2.18 – Metodo HPLC per la quantificazione di acidi organici, mono e di-saccaridi. Sono riportati il flusso della fase mobile e i valori di pressione corrispondenti, così impostati per mantenere costante il flusso.**

Il metodo di calibrazione dell'HPLC è stato condotto in triplicato con concentrazioni standard tra 0.1 g/l e 10 g/l per ogni composto. I tempi di ritenzione ottenuti sono elencati in tabella 2.19.

<b>Saccarosio</b>	7.83 min
<b>Lattosio</b>	8.09 min
<b>Glucosio</b>	9.24 min
<b>Fruttosio</b>	10.14 min
<b>Galattosio</b>	11.4 min
<b>Acido Lattico</b>	11.6 min
<b>Acido Acetico</b>	15.45 min

**Tab. 2.19 – Tempi di ritenzione per acidi grassi, mono- e disaccaridi, rilevati dall' HPLC.**

Le rese di conversione del substrato in idrogeno, anidride carbonica ed acetato sono calcolate considerando i carboidrati consumati. In presenza di disaccaridi viene considerata la concentrazione equivalente di monosaccaridi.



## 2.13 ANALISI MOLECOLARI

Le colture batch sono monitorate attraverso tecniche di analisi molecolare per confermare l'assenza di contaminazioni da parte di altri microrganismi. E' stato estratto il DNA dalle cellule in coltura, il 16SrDNA è stato amplificato, purificato e sequenziato; il DNA è stato inviato al servizio di sequenziamento genomico "BMR-genomics service" dell'Università di Padova (Padova, Italia).

### ESTRAZIONE DNA GENOMICO

Il protocollo di estrazione del DNA è qui riportato. Il protocollo è stato eseguito in ghiaccio e con centrifuga refrigerata se non altrimenti specificato. 25-30 ml di cellule cresciute per 40-60 h sono state centrifugate a 7000 rpm per 15 minuti e successivamente risospese in 1 ml di buffer TE in una eppendorf da 1.5 ml. Le cellule sono state lavate due volte risospingendole in una soluzione tampone TE a temperatura ambiente. Ai campioni è stato aggiunto SDS 10% a temperatura ambiente. I campioni sono quindi stati incubati per 5 minuti a 65 °C e successivamente è stato addizionato 1/10 di volume di NaOAC 3M, pH 5.2. L'estrazione del DNA è stata effettuata attraverso l'addizione di 1 volume di fenolo:cloroformio:isoamilalcol 25:24:1 a temperatura ambiente. I campioni sono stati miscelati invertendo energicamente la eppendorf. Le due fasi sono state separate attraverso la centrifugazione per 10 minuti a 13000 rpm a temperatura ambiente ed è stata recuperata la fase acquosa. Le fasi di estrazione del DNA sono state ripetute due volte. L'estrazione del fenolo è stata ottenuta con l'addizione di un volume di cloroformio:isoamilalcol 24:1 a temperatura ambiente, invertendo poi la eppendorf vigorosamente. Le due fasi sono state separate mediante centrifugazione° 13000 rpm per 5 minuti; è stata recuperata la fase acquosa contenente il DNA facendo attenzione a non prelevare la fase contenente il fenolo. La metodica di estrazione con il fenolo è stata ripetuta per due volte. Si è proceduto alla precipitazione del DNA attraverso l'addizione di 6/10 di volume di isopropanolo a temperatura ambiente, un passaggio in centrifuga per 30 minuti alla massima velocità (13400 rpm), scartando infine il surnatante. Il pellet è stato lavato con 500 µl di EtOH 70% a 4°C. E' stato effettuato un ultimo passaggio di centrifuga, 5 minuti a 13000 rpm, scartando poi il surnatante. Infine il pellet è asciugato lasciando la eppendorf aperta per circa 15 minuti e risospeso con 50 µl di acqua milliQ. Ai 5-10 µl di DNA è stato aggiunto 1 µl di RNasi (10mg/ml) per eliminare l'acido ribonucleico: la reazione è stata incubata per 1h a 37°C. Il DNA è stato quantificato mediante misurazione dell'assorbanza a 260 nm con lo strumento NanoDrop.

## AMPLIFICAZIONE ED ANALISI DELL' rDNA 16S

L'amplificazione dell'rDNA 16S è stata effettuata con la tecnica di PCR (*Polymerase Chain Reaction*), con un termociclatore a gradiente di temperatura Thermoblock® (Biometra, Germania) seguendo lo schema illustrato nella tabella 2.20.

Concentrazioni Soluzioni	Concentrazioni Finali
DNA genomico	50 ng
Tampone PCR (10X)	1X
dNTPs	0.1 mM
Primer Forward	0.4 µM
Primer Reverse	0.4 µM
Taq DNA Polimerasi (Eppendorf)	0.03 U/µL
H <sub>2</sub> O	to 50 µL

Tab. 2.20 – Componenti reazione PCR.

Le seguenti tabelle (Tab. 2.21 e Tab. 2.22) descrivono rispettivamente la coppia di primers usati per l'innesco della reazione di amplificazione di PCR e le condizioni di amplificazione.

Nome	Sequenza
27f	5' – AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3'
1492r	5' – GGTTACCTTGTTACGACTT – 3'

Tab. 2.21 – Coppia di primers per l'amplificazione del rDNA 16S con PCR.

Programma di amplificazione		
Temperatura	Tempo	Numero di cicli
95°C	4 min	1
95°C	45 s	29
55°C	45 s	
72°C	45 s	
72°C	5 min	1

**Tab. 2.22 – Condizioni per l'amplificazione del rDNA 16S con PCR**

Le bande di rDNA 16S amplificato sono state fatte correre su un gel di agarosio 0.7% in buffer TAE (basa Trizma 0.04 M, acido acetico glaciale 0.02 M, Na<sub>2</sub>EDTA 1mM a pH 8.0 in acqua deionizzata). Le bande della lunghezza attesa sono state tagliate dal gel ed il DNA è stato purificato usando un kit commerciale di estrazione da gel (QIAGEN). Successivamente, il DNA è stato quantificato al NanoDrop ed i campioni impiegati successivamente per il sequenziamento sono stati preparati seguendo la procedura consigliata (<http://www.bmr-genomics.it/>).

### 3.8 IL REATTORE SPCSTR

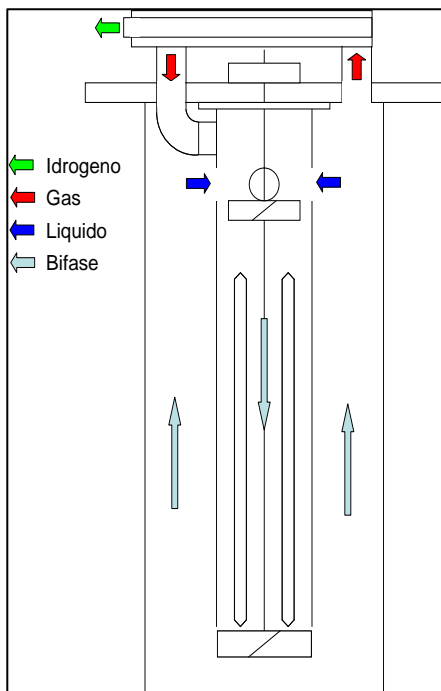


**Figura 2-3: visione frontale del SPCSTR**

Lo Structured Packing Continuous Stirred Tank Reactor (SP)CSTR, reattore da 19L con diametro di 0.23 m e rapporto altezza / diametro =2 che é stato progettato e realizzato nel corso dei primi due anni di dottorato ed è in continua evoluzione. Numerosi sono gli studi svolti con batteri ipertermofili utilizzando sia in colture pure che con consorzi batterici derivati da fanghi di depurazione o da impianti di digestione anaerobica con diverse tipologie reattoristiche condotte utilizzando diverse fonti di carbonio: Continuous stirred tank reactors CSTR (Fang and Liu, 2002), Anaerobic granular sludge bed AGSB (Hung et al., 2007), Up-flow anaerobic sludge bed UASB (Thomas A. Kotsopoulos et al., 2005), sistemi a letto fluido (Christian Peintner et al. 2010), a letto gocciolante (Christian Peintner et al. 2010). Il nostro gruppo di ricerca ha preferito sperimentare un innovativo bioreattore basato sul comune CSTR ma modificandolo al fine di correggere alcuni aspetti negativi del chemostato tradizionale.

Il reattore é stato realizzato in acciaio inox, del volume di 19 L ( $T = 0.23$  m,  $H/T = 2$ ), dotato di:

1. 2 specole in vetro
2. 2 giranti di tipo PBT, che pompano verso il basso
3. sparger per la distribuzione di gas (azoto) alimentato dal basso
4. draft tube centrale con fori al di sopra della girante superiore
5. controllo di pH (ON/OFF)
6. misuratore di portata del biogas prodotto
7. predisposizione per il collegamento al circuito di purificazione del biogas
8. alloggiamento per sacchetti in rete inox per supporti

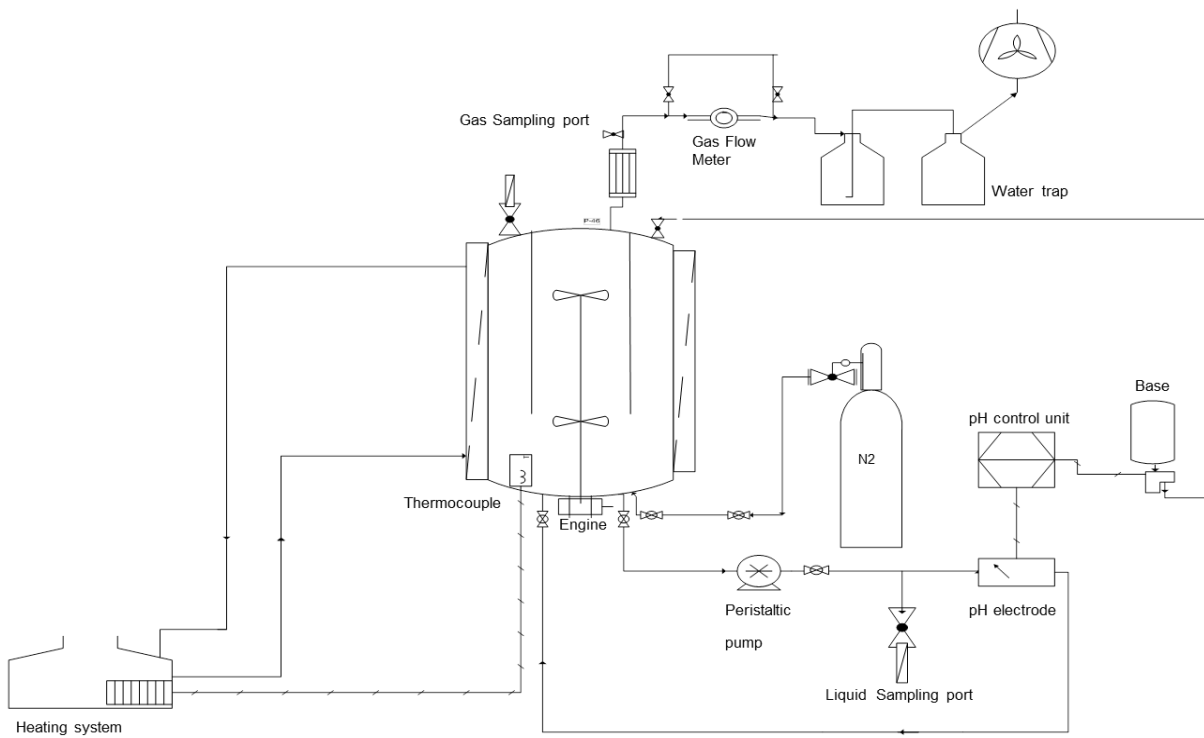


L'inserimento nel reattore di un *draft tube* interno, combinato con l'utilizzo di 2 giranti di tipo PBT determinano la generazione di un moto convettivo fra l'interno e l'esterno del draft tube verso il basso. Ciò consente di ottenere una leggera depressione nello spazio di testa del *draft tube*, e quindi una circolazione del biogas nel circuito di purificazione dell'idrogeno, evitando l'impiego di un'ulteriore forza motrice.

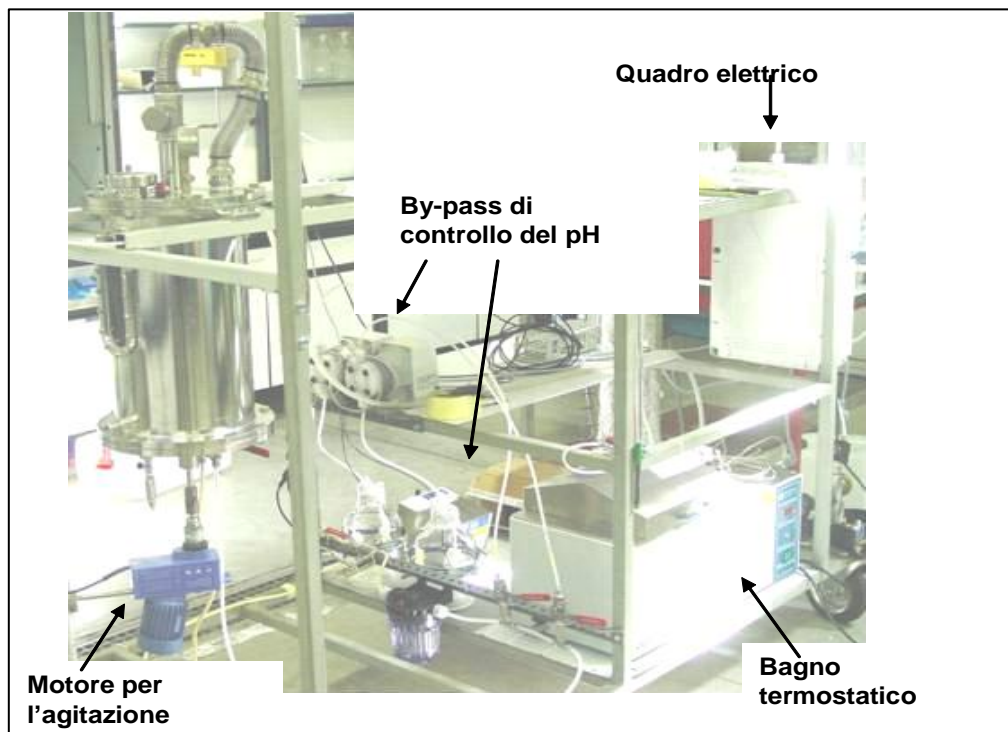
**Figura 2.4: schema in sezione trasversale del reattore**



**Figura 2.5: cestello con sacchetti riempiti di supporti e suo alloggiamento all'interno del reattore**



**Figure 2.6: Primo schema del reattore in configurazione batch**



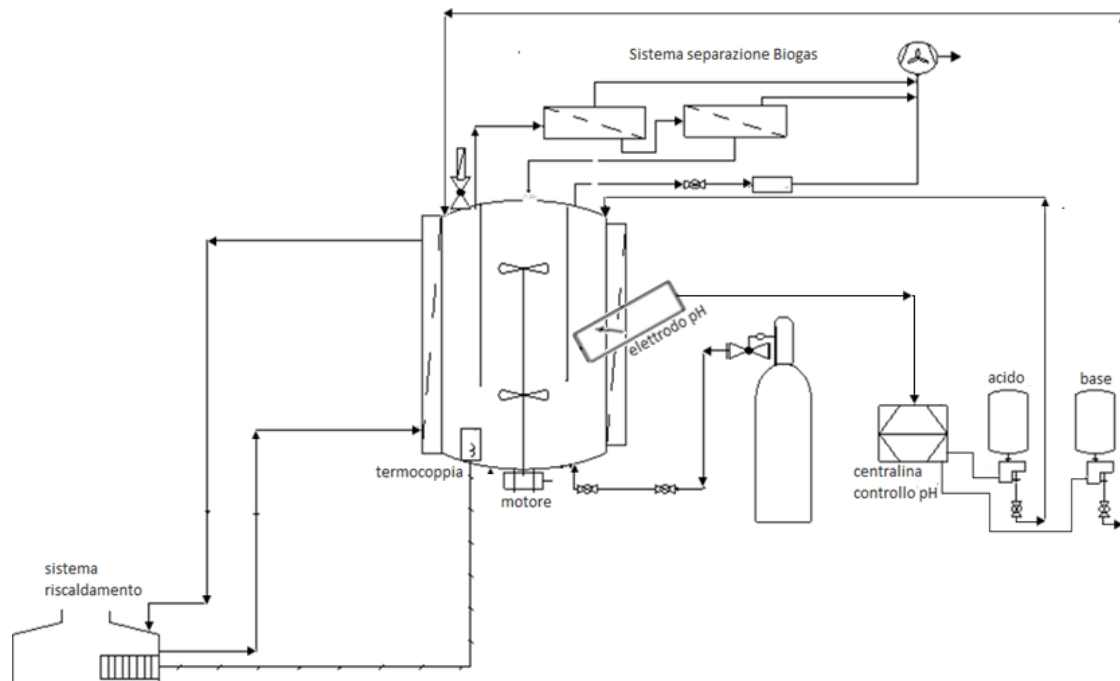
**Figure 2.7: SPCSTR, vista completa**

## DESIGN & SVILUPPO del BIOREATTORE

Essendo questo il primo progetto di reattore realizzato interamente all'interno del laboratorio DICMA questi 3 anni di dottorato sono stati spesso impiegati al continuo set-up del sistema con migliorie continue volte a ottenere uno strumento quanto più conforme all'attività per cui è stato progettato. Il lavoro svolto durante il PhD non si potrebbe quindi ritenere completo se non fossero qui di seguito elencate e descritte almeno alcune di queste migliorie. A seguito delle frequenti problematiche e soventi rotture riscontrati infatti nella prima configurazione, il reattore ha subito un lungo upgrade ed è stato quindi opportunamente modificato in diverse parti.

L'iniziale tenuta meccanica utilizzata per il sistema di agitazione dal basso è stata modificata con una doppia tenuta che funziona sotto leggera pressione e che è raffreddata da acqua di rete. Questo dovrebbe permettere una più lunga vita della tenuta con conseguente riduzione dei problemi che ne definiscono la sostituzione. Il sistema di tenuta meccanica infatti è costituito da due dischi di materiali diversi, aventi diversa resistenza all'abrasione, uno fisso e l'altro rotante. Un sottile film di liquido fra i due dischi determina la tenuta del sistema. Inizialmente l'unica tenuta impiegata era lambita dallo stesso brodo di coltura. La temperatura di quest'ultimo e in secondo luogo, durante le prove a biomassa adesa, la presenza di materiale fine rilasciato dal supporto Biomax a causa delle forze di taglio determinate dal sistema di agitazione, hanno determinato la rottura di due tenute meccaniche. Avendo però ora un sistema a doppia tenuta in cui entrambi i meccanismi sono a bagno in acqua di rete la vita della tenuta dovrebbe aumentare di molto viste le migliori condizioni operative.

Il bypass pH in acciaio INOX progettato inizialmente prevedeva in esso il punto di lettura del parametro e un punto di dosaggio della base. Questo by-pass è stato eliminato. Attualmente infatti la base viene dosata direttamente nel reattore. Utilizzando un fine tubo INOX opportunamente modellato, la soda viene rilasciata vicino alle giranti, all'interno del draft tube. Questo accorgimento ha due principali vantaggi: velocizza di molto la correzione del pH grazie ad un immediato rimescolamento del medium; evita di causare forte stress alla biomassa che precedentemente veniva in contatto con la soda nel punto di dosaggio previsto sul by-pass. Anche il punto di misura del pH, la sede fisica dell'elettrodo, è stato cambiato. Esso è stato posizionato direttamente all'interno del reattore grazie ad un apposito connettore a tenuta che attraversa la camicia riscaldante. Questo ha reso la lettura e la correzione più veloci ed accurate (Fig 2.7).



**Figura 1.8: Secondo schema impianto configurazione batch**

Eliminando il by-pass pH il punto di inserimento dell'inoculo batterico è stato sostituito. Anche in questo caso è stato preferito l'utilizzo di un'apposita linea di ingresso realizzata sulla flangia superiore del reattore. L'inoculo percorrere un'unica via definita da un tubo di acciaio che termina sotto il pelo libero del medium di coltura. Questa soluzione ha il vantaggio di minimizzare lo stress da trasferimento alla biomassa inoculata permettendogli di seguire la più breve e diretta via di ingresso per raggiungere il medium di coltura. L'eliminazione del by-pass ha portato ad un altro vantaggio: l'eliminazione della pompa peristaltica che lo azionava.

La linea di uscita del biogas è stata aggiornata sostituendo la rubinetteria di ottone nikelato con rubinetteria di acciaio INOX, questo evita l'usura che era frequente con le precedenti valvole e le possibili otturazioni della linea gas out; Gli O-ring di tenuta posti sulle flange, originariamente in Teflon sono stati sostituiti con O-ring in Norprene più elastici e quindi capaci di sopportare numerose aperture del reattore nel caso di campionamento dei solidi o soprattutto per le fasi di pulizia.

Ognuna di queste modifiche ha richiesto tempo per essere definita, acquisita e installata. Ovviamente il reattore, soprattutto nel caso di perdite da parte della tenuta meccanica o del biogas prodotto, è stato inoperativo e ciò ha limitato fortemente il numero di prove sperimentali pianificate.

Dopo le prove batch, il reattore è stato preparato per funzionare in continuo utilizzando terreni minimi a base di siero di latte e sfruttando la biomassa adesa ai supporti. Lo studio si focalizza primariamente sull'utilizzo del siero di latte come fonte principale di carbonio. Ovviamente anche

il passaggio al funzionamento in continuo ha comportato lo studio, la progettazione e la realizzazione di serbatoi a tenuta per lo stoccaggio del terreno fresco e per la raccolta degli effluenti di processo. E' stato poi realizzato un sistema del tipo "*troppo pieno*" per il mantenimento del livello di liquido all'interno del reattore. Il sistema é stato poi implementato con l'aggiunta una pompa peristaltica che permette il feeding del medium di coltura.



## RISULTATI E CONCLUSIONI

### 3.1 INIBIZIONE DA PRODOTTI DI FERMENTAZIONE E SCELTA DEL MIGLIOR BUFFER PER I TEST BATCH

Uno dei limiti delle colture di tipo batch durante la crescita di batteri come *Thermotoga* è l'acidificazione del medium dovuta alla produzione di acidi organici che accompagna la genesi dell'idrogeno. Al fine di valutare il grado di inibizione da parte dei prodotti solubili *T. neapolitana* è stato fatto crescere sul terreno modATCC 1977 avente come fonte principale di carbonio il glucosio. La coltura è stata monitorata per 70h. È stato osservato che la velocità di produzione di  $H_2$  si riduce all'aumentare della concentrazione di acidi organici nel medium. A distanza di 48h il pH del medium si attestava a valori pari a 5 (Fig 3.1). Questo ci ha indicato che il buffer fosfato biacido/monoacido 4mM presente nel terreno di coltura non è sufficiente a tamponare l'acidità generata durante la fermentazione del glucosio.

Al fine di valutare quindi se una correzione del pH sortisse effetti positivi sulla produzione di idrogeno una soluzione di 2M di NaOH è stata aggiunta a 2 vial di *T. neapolitana* dopo 48h di crescita, riportando il pH al valore iniziale (Fig 3.1). Altre due vial invece sono state mantenute come controllo negativo. Il risultato di questo test è stata una ripresa nella produzione di  $H_2$  nelle colture dove NaOH 2M è stata aggiunta mentre nei controlli negativi non si è osservata alcuna ripresa.

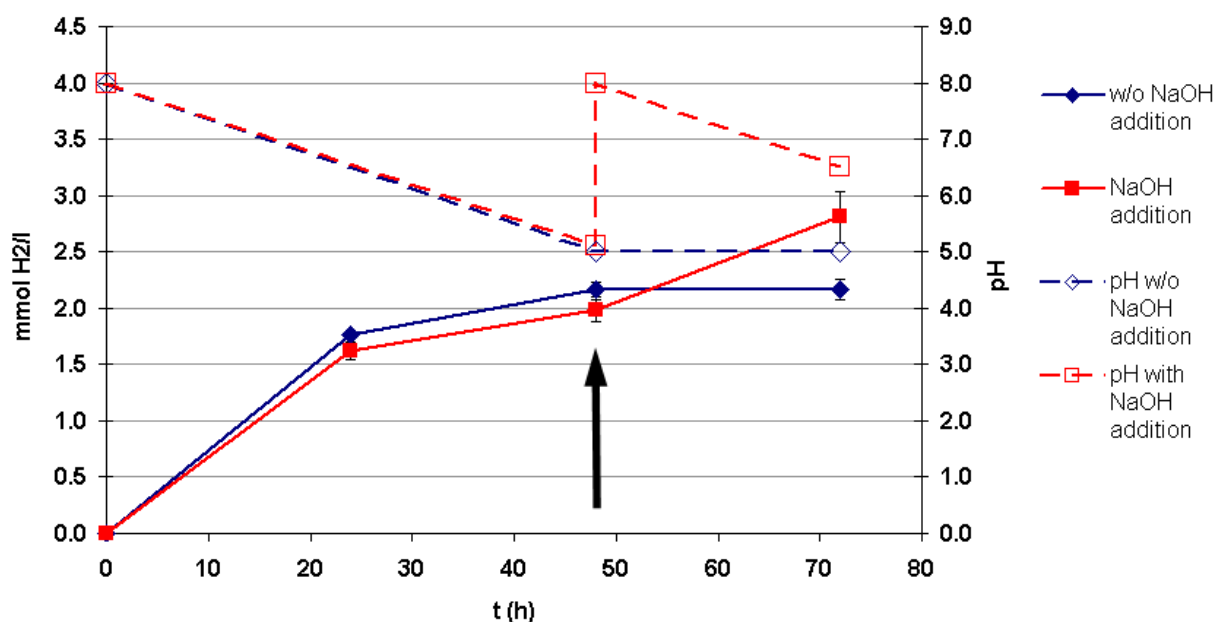
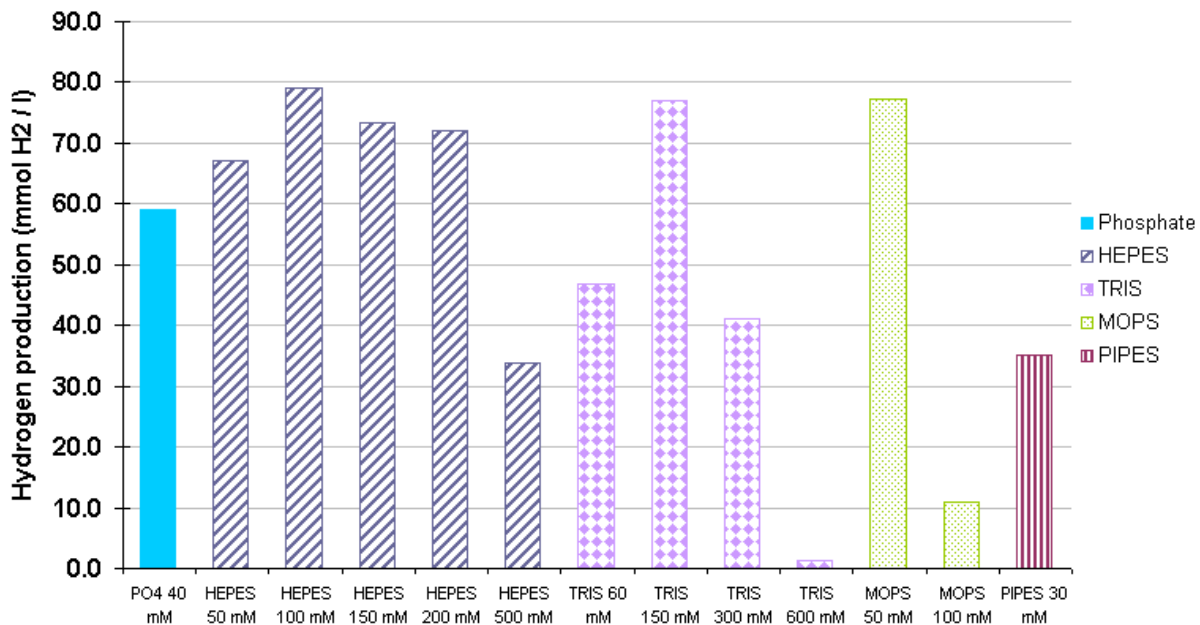


Fig. 3.1 – Inibizione da pH acido sulla produzione di idrogeno con *T. neapolitana* su modATCC 1977 medium con buffer fosfato 4 mM. Linee rosse: fermentazione condotta con aggiunta di NaOH dopo 48 h; linee blu fermentazione condotta senza aggiunta di NaOH; linee continue, produzione totale di idrogeno; linee tratteggiate, pH.

Visto che questi risultati hanno mostrato la necessità di trovare un sistema tamponante migliore rispetto al buffer originale del medium, la crescita di *T. neapolitana* è stata condotta testando l'impiego di diversi buffer (tabella 2.6).

La capacità tamponante è stata valutata incrementando la concentrazione del buffer fosfato originale o sostituendolo completamente lo stesso con tamponi organici e inorganici a diverse concentrazioni. In Fig. 3.2 vengono mostrate le produzioni finali di H<sub>2</sub> nei diversi batch.



**Fig. 3.2 – Produzioni di idrogeno condotte con *T. neapolitana* su modATCC 1977 medium e con i buffer indicate in legenda a diverse concentrazioni. Confronto effettuato a 68-72h.**

I valori finali di produzione H<sub>2</sub> con l'aggiunta di HEPES 100 mM, MOPS 50 mM, TRIS 150 mM, buffer fosfato 40 mM, e PIPES 30 mM sono stati rispettivamente di 79.0 mmol H<sub>2</sub>/l, 77.3 mmol H<sub>2</sub>/l, 76.9 mmol H<sub>2</sub>/l, 59.1 mmol H<sub>2</sub>/l, e 35.0 mmol H<sub>2</sub>/l (Fig. 3.3).

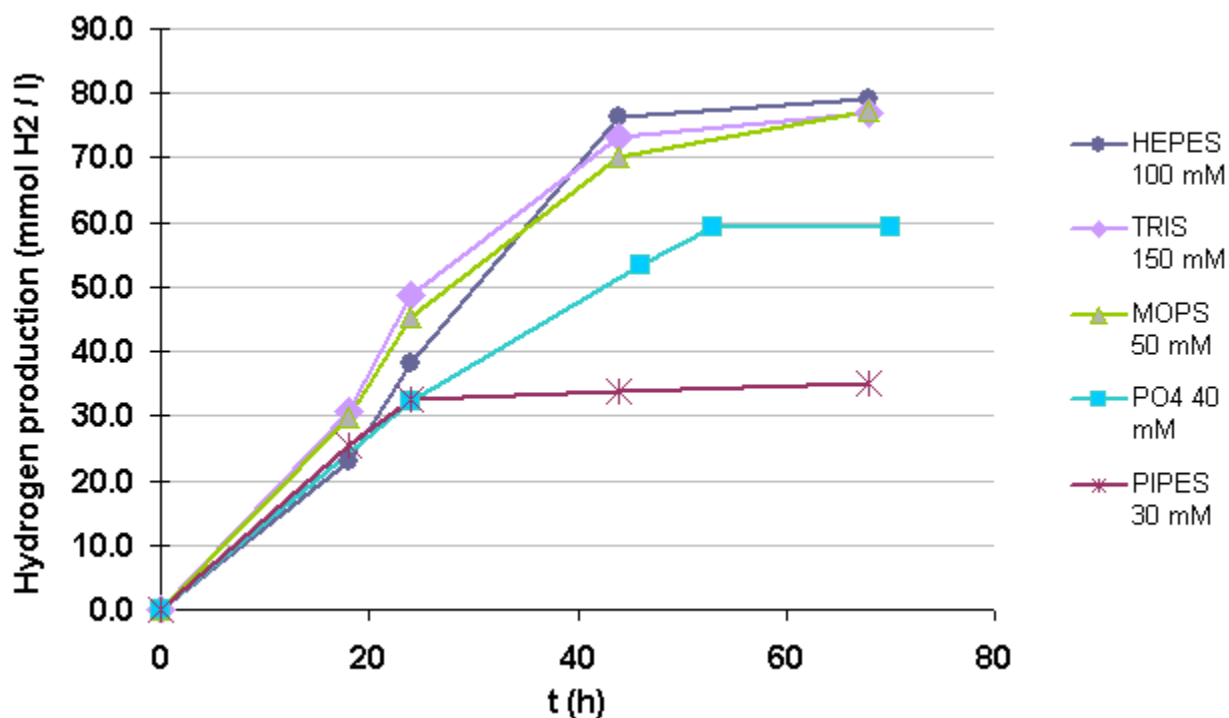


Fig. 3.3 – Produzione di idrogeno nel tempo con coltura di *Th. neapolitana* su modATCC 1977 medium con diversi buffer. Le concentrazioni considerate sono in legenda.

Inoltre, il calo del pH dovuto alla produzione di acidi organici durante la fermentazione condotta con *T. neapolitana* è mostrato in Figura 3.4.

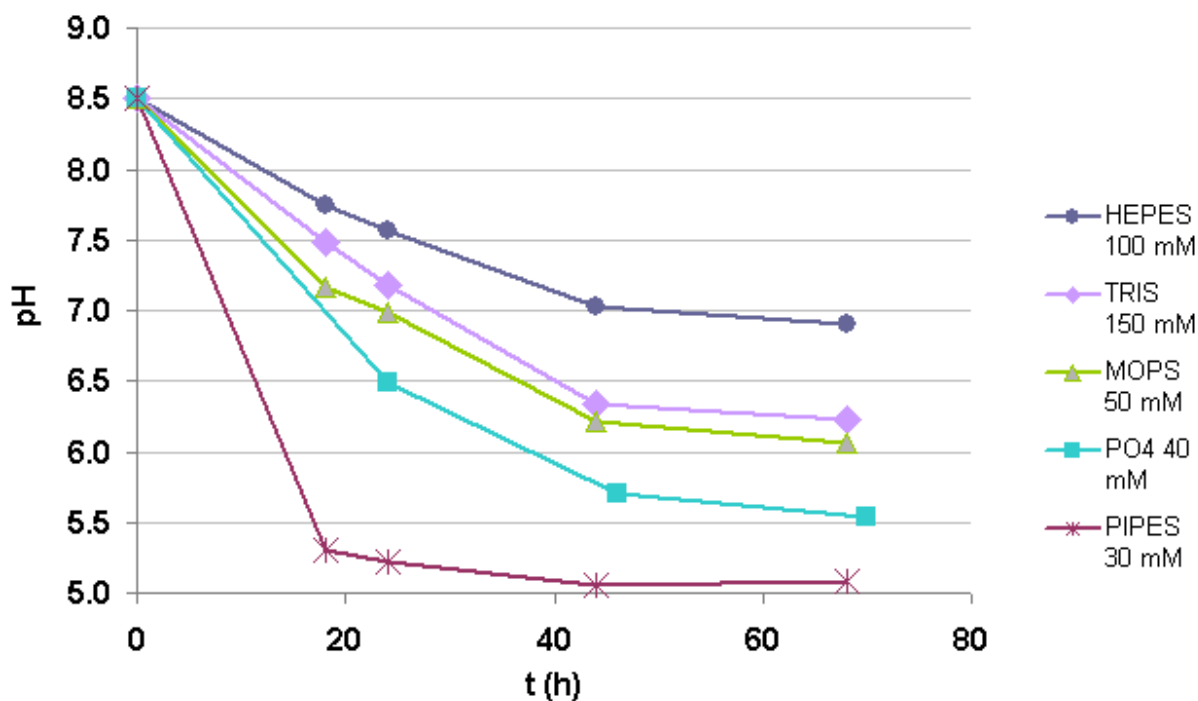


Fig. 3.4 – Variazione del pH nel tempo in colture di *T. neapolitana* su ATCC 1977 medium. Le concentrazioni considerate sono in legenda.

Il pH finale misurato nei test in cui sono stati testati HEPES 100 mM, TRIS 150 mM, MOPS 50 mM, buffer fosfato 40 mM, PIPES 30 mM sono stati rispettivamente di 6.9, 6.2, 6.1, 5.5 and 5.1. Si è osservata una migliore capacità tamponante mediante l'impiego di una concentrazione decuplicata di buffer fosfato ma anche in questo caso il calo del pH è stato veloce: da pH 8.5 a pH 5.5 in 72h (Fig. 3.3) rispetto ad un calo da 8.5 a 5.0 in 48h. Perciò un sistema tamponante più efficace è assolutamente necessario. In linea teorica questo permetterebbe anche di testare la fermentazione con concentrazioni di substrato iniziale più alto, le quali sono certamente accompagnate da produzioni più abbondanti di acidi. Per questo i buffer organici (TRIS, PIPES, MOPS, HEPES) sono stati selezionati per la loro capacità di mantenere più a lungo il pH a valori ottimali (attorno alla neutralità), per la loro capacità tamponante e per la loro inerzia chimica nei confronti delle cellule batteriche. Il loro utilizzo infatti ha mostrato produzioni di idrogeno maggiori (Fig 3.3). Più nel particolare tutte le concentrazioni risultate ottimali per ogni buffer organico (HEPES 100mM, TRIS 150mM e MOPS 50 mM), fatta eccezione per l'PIPES hanno restituito produzioni ( $76.9 \div 79.0$  mmol H<sub>2</sub>/l) più alte rispetto a quelle ottenute in presenza di buffer fosfato 40 mM (59.1 mmol H<sub>2</sub>/l). Il pH finale è risultato essere sempre più alto di 5.5 ottenuto con buffer fosfato. Infatti, valori finali di pH di 6.9, 6.2 e 6.1 sono stati osservati con l'utilizzo, rispettivamente, di HEPES 100 mM, TRIS 150 mM and MOPS 50 mM. Perciò i buffer organici (eccetto il PIPES) si sono dimostrati migliori rispetto ai buffer inorganici in termini di capacità tamponante tradotta in produzione di idrogeno da *T. neapolitana* in colture batch.

L'utilizzo di costosi buffer organici è giustificato dalla piccola scala in cui vengono eseguiti gli esperimenti batch. Nei processi su scala maggiore (reattore pilota) il buffer verrà sostituito con un sistema di controllo del pH mediante aggiunta di base in modo da rendere più conveniente il processo. La Fig. mostra inoltre che HEPES è stato, fra tutti i buffer testate, quello che ha mostrato le più alte produzioni totali di idrogeno durante il processo fermentativo condotto con *T. neapolitana*. Dettagli sulla produzione di H<sub>2</sub> e sui valori di pH finali ottenuti con diverse concentrazioni di HEPES nel terreno di coltura sono mostrati in Fig 3.5 e 3.6 La produzione totale di H<sub>2</sub> e i valori finali di pH sono stati, rispettivamente 79.0 mmol H<sub>2</sub>/l e 7.0 utilizzando HEPES 100 mM, 73.3 mmol H<sub>2</sub>/l e 7.5 con HEPES 150 mM, 72.0 mmol H<sub>2</sub>/l e 7.6 con HEPES 200 mM, 67.1 mmol H<sub>2</sub>/l e 6.0 con HEPES 50 mM, e infine 33.8 mmol H<sub>2</sub>/l e 8.1 con HEPES 500 mM.

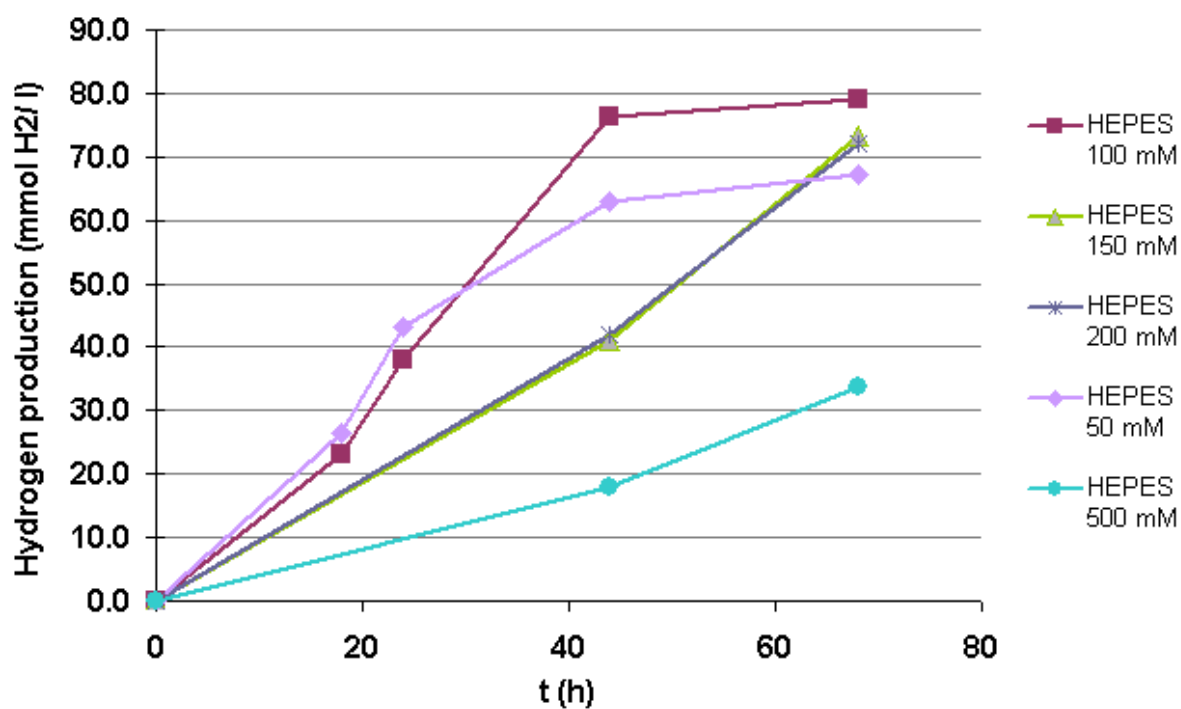


Fig. 3.5– Produzione di idrogeno nel tempo nel modATCC 1977 medium con HEPES a diverse concentrazioni.

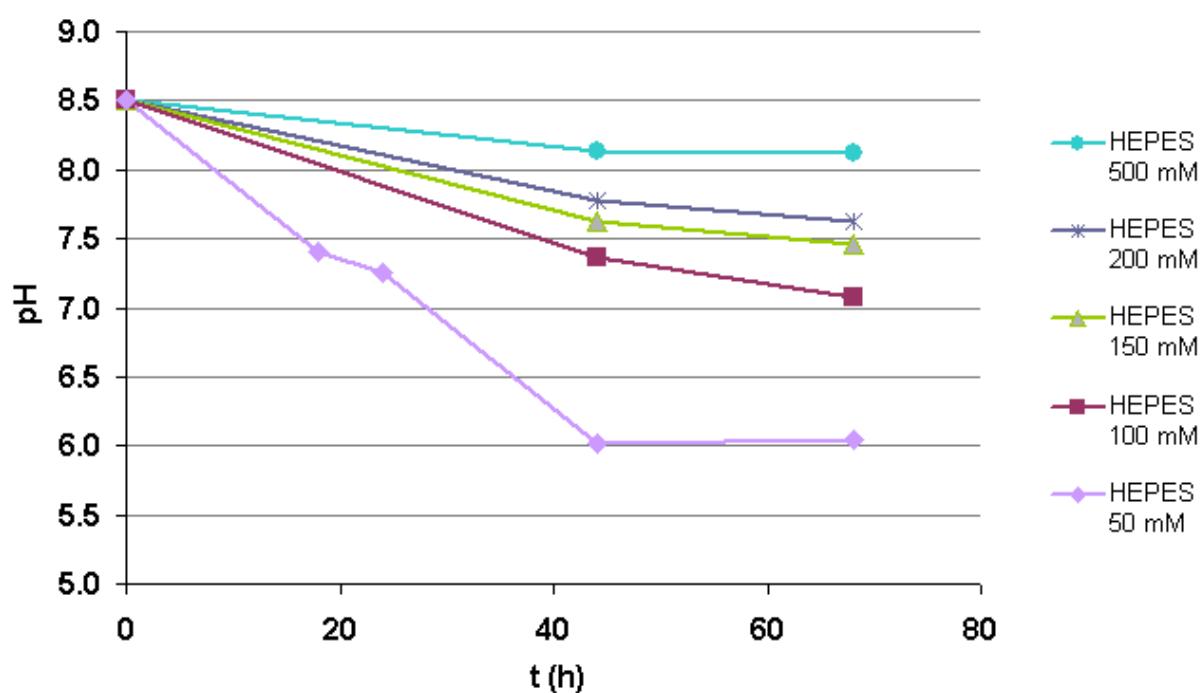


Fig. 3.6 – Variazione del pH nel tempo su modATCC 1977 medium con HEPES a diverse concentrazioni.

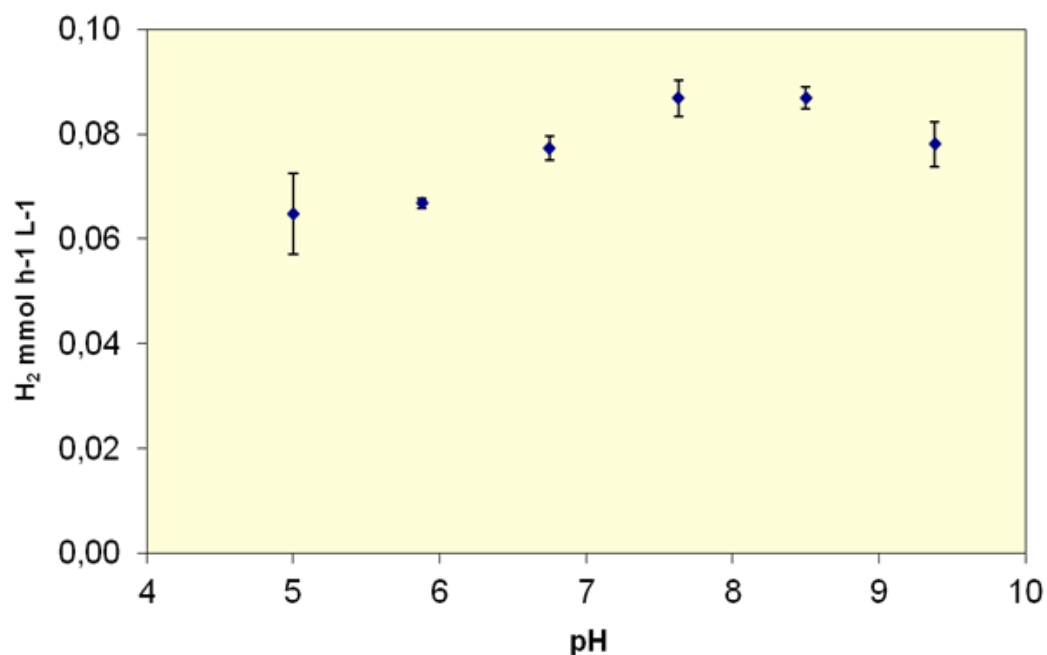
Le colture di *T. neapolitana* cresciute su modATCC 1977 con HEPES a concentrazione variabile fra 50 e 20mM hanno mostrato le migliori produzioni in termini di H<sub>2</sub> con un'appropriata capacità tampone. La concentrazione scelta per le successive prove batch è stata la 100mM vista la migliore produzione di H<sub>2</sub>/L di coltura. HEPES 150 o 200 mM possono essere utilizzate per medium contenenti glucosio in concentrazione superiore ai 7.5g/L.

### **3.2 SELEZIONE DEL pH OTTIMALE PER LA PRODUZIONE DI H<sub>2</sub> DA *T. NEAPOLITANA* CRESCIUTO SU BIOMAX**

Nel processo fermentativo sono prodotte grandi quantità di acidi organici, per questo il pH può facilmente abbassarsi di diversi ordini di grandezza. Sin ora solo alcuni studi hanno riportato il valore di pH iniziale ottimale per la produzione di H<sub>2</sub>. Sebbene un semplice sistema di addizione acido/base può mantenere il pH ottimale in processi su vasta scala, in colture batch non è auspicabile un'eventuale inibizione da pH, vista la stretta connessione che questo parametro ha con la produzione di H<sub>2</sub>.

I test a biomassa adesa riportati di seguito sono stati eseguiti con *T. neapolitana* cresciuto sul terreno definito ATCC 1977 addizionato con glucosio (7.5 g/l) come principale fonte di carbonio. Il test è eseguito come descritto nella sezione 3.3 di Materiali e Metodi. Nel secondo stadio dell'esperimento, ai campioni contenenti i supporti con la biomassa adesa sigillati in atmosfera d'azoto è stato aggiunto il terreno fresco corretto ai differenti valori di pH analizzati, precisamente 5, 5.88, 6.75, 7.63, 8.5 e 9.38.

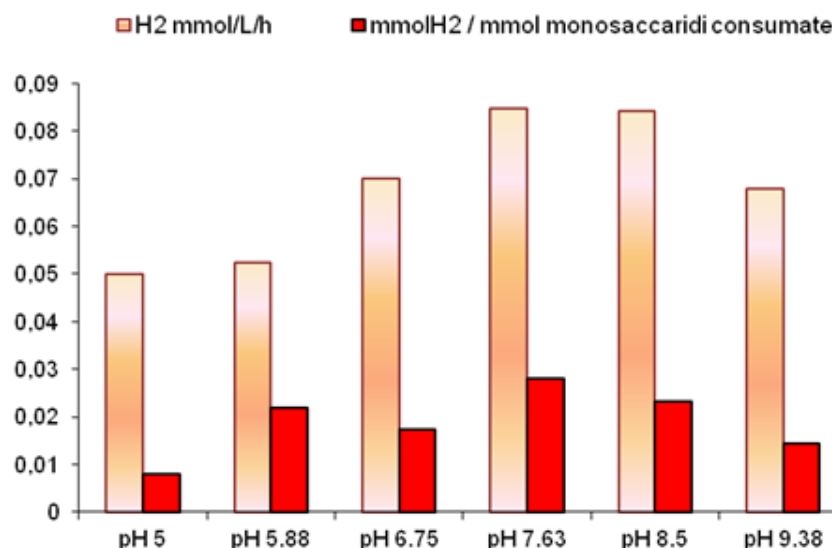
La Fig. 3.7 descrive l'indagine effettuata sulla produzione di H<sub>2</sub> da *T. neapolitana* alla temperatura di crescita ottimale, in un terreno a diversi valori di pH. Quando il valore di pH iniziale cresce da 5 a 7, si registra un aumento nella velocità di produzione volumetrica di idrogeno, da 0.065 a 0.077 mmolH<sub>2</sub>/L/h; l'aumento del pH iniziale nell'intervallo tra 7.63 e 8.5 risulta nel raggiungimento del massimo valore di velocità di produzione di H<sub>2</sub> iniziale (0.087 mmolH<sub>2</sub>/L/h ) che torna a diminuire nel terreno con pH iniziale pari a 9.38.



**Fig. 3.7 – Velocità iniziale di produzione di H<sub>2</sub> (test di 4h) di *T. neapolitana* cresciuto su Biomax in terreno con glucosio a diversi valori di pH iniziale.**

Nella Figura 3.8 i valori di velocità di produzione di H<sub>2</sub> sono associati alle rese di conversione del substrato in prodotto; analogamente ai valori di velocità, anche in questo caso la massima resa si registra nei test con un intervallo di pH iniziale pari a 7.6 – 8.5. I risultati mostrano un effetto significativo dei diversi valori di pH iniziale sulla produttività di *T. neapolitana* in termini di produzione di idrogeno e conversione dei substrati forniti per la crescita, ciò implica il fatto che il controllo di questo parametro è determinante per il processo di produzione di H<sub>2</sub> da parte di questo microorganismo.





**Fig. 3.8 – Velocità iniziale di produzione di H<sub>2</sub> e rese di conversione del S/H<sub>2</sub> per *T. neapolitana* cresciuto su Biomax in terreno con glucosio a diversi valori di pH iniziale.**

Studi precedenti hanno anche evidenziato che il controllo del pH è un fattore cruciale per la produzione di H<sub>2</sub> per l'influenza che il pH può avere sull'attività delle idrogenasi. Diversi studi hanno individuato un pH iniziale ideale per condurre delle fermentazioni in batch, analisi più accurate possono essere ottenute da processi di fermentazioni in continuo per la scelta di un *optimum* di pH per la produzione di idrogeno.

### 3.3 CORRELAZIONE FRA PESO SECCO E CONTENUTO PROTEICO

La valutazione della crescita della biomassa di *T. neapolitana* in colture di tipo batch è stata valutata in studi precedenti utilizzando diversi parametri, ad esempio la densità ottica (OD) a 600nm, camera di conta cellulare Petroff-Hauser [72], coulter counter<sup>[69]</sup>, conteggio diretto al microscopio su fase di contrasto<sup>[35]</sup>, OD a 700 nm<sup>[64]</sup>, OD a 670 nm, contenuto proteico con saggio di Bradford<sup>[68]</sup>, e peso secco<sup>[70]</sup>. Questa ampia varietà di metodologie riflette la complessità nella determinazione della biomassa in *T. neapolitana*. Questo è principalmente dovuto alla sua innata tendenza a formare agglomerati cellulari e a formare grossi flocculi durante la crescita. Inoltre, il metodo standard di quantificazione su piastra agarizzata non è possibile in condizioni termofile in quanto l'agar non è solido a 77°C. Piastre di cellulosa<sup>[36]</sup> sono state sviluppate per essere incubate ad alte temperature e pressioni ma esse non sono economiche. Oltre a ciò sono necessarie camere anaerobiche per permettere la crescita su piastra.

Il nostro gruppo di ricerca ha identificato come analisi di quantificazione cellulare il saggio per la quantificazione proteica Lowry nel caso delle colture sospese mentre è stato scelto il metodo del peso secco per la quantificazione della biomassa adesa a supporti. Il rapporto fra peso secco e

contenuto proteico è stato determinato a 3.30. Il contenuto proteico dovrebbe quindi corrispondere ad un 30% del peso secco totale di *T. neapolitana*. In ogni caso la correlazione  $R^2$  è risultata essere di 0.90 e questo indica che serve eseguire una correlazione migliore per poter avere un dato più solido.

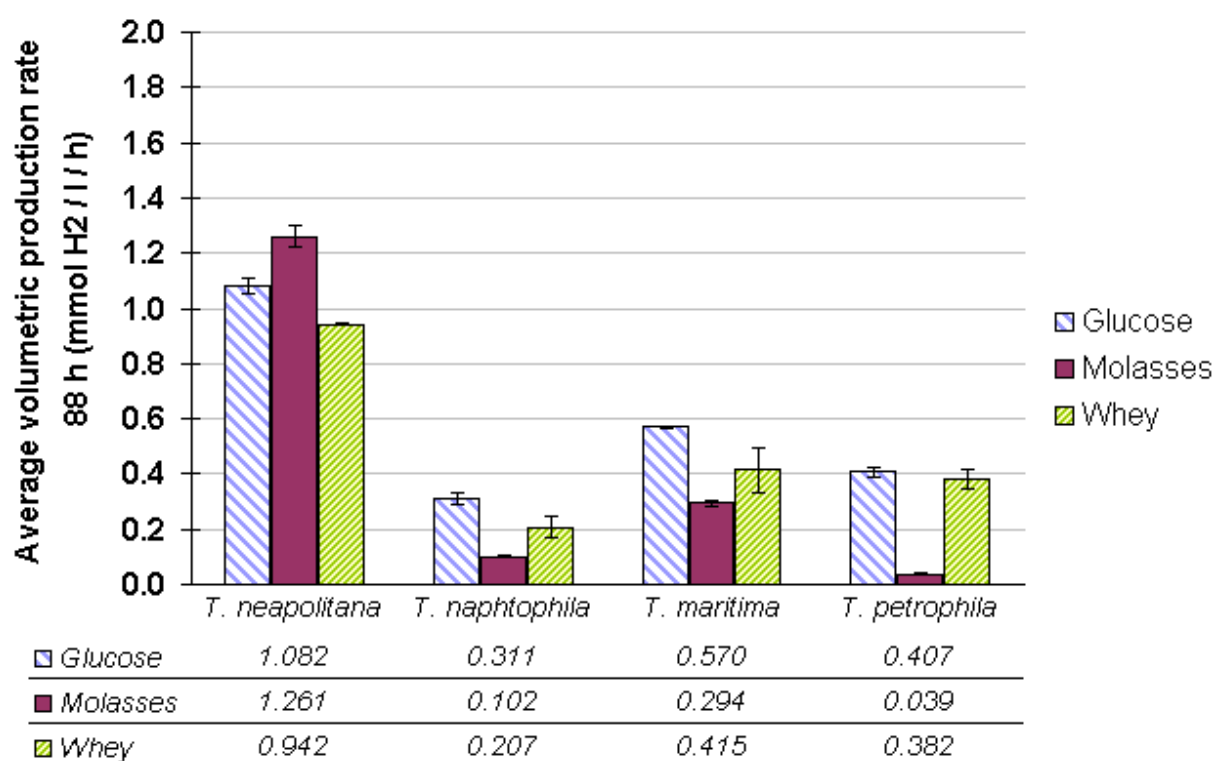
### 3.4 PRODUZIONE DI IDROGENO CON COLTURE SOSPENSE DI 4 DIVERSI CEPPI DI *THERMOTOGA*

I 4 ceppi di *Thermotoga* sono stati testati per valutare le loro produttività in idrogeno su glucosio, melasso e siero di latte in termini di produzione volumetrica, rese di conversione del substrato in idrogeno e rese di conversione del substrato in biomassa.

Mentre la letteratura descrive abbondantemente la produzione di idrogeno da *T. neapolitana* poco si trova in merito alle produzioni ottenibili dagli altri 3 ceppi di *Thermotoga* testati. La carenza di letteratura su questi ceppi alternativi potrebbe portare ad un confronto influenzato da una carenza nell'ottimizzazione del terreno di coltura utilizzato con *T. maritima*, *T. naphthophila* e *T. petrophila*. In particolare le ultime due specie non sono mai state studiate per la produzione di idrogeno.

Le figure 3.9 e 3.10 Mostrano le produzioni volumetriche delle diverse specie di *Thermotoga* da glucosio, melasso e siero di latte. I parametri utilizzati per stimare e confrontare le capacità produttive sono media delle velocità di produzione dopo 43-44 e 88-89h di coltura batch..

Considerando I valori medi di velocità di produzione a fra 88 e 96 h (Figura 3.9) *T. neapolitana* ha mostrato le più alte produttività con l'impiego di un medium a base di glucosio (1.08 mmol  $H_2$ /L/h). *T. maritima* ha raggiunto produzioni dimezzate (0.570 mmol  $H_2$ /l/h). *T. petrophila* e *T. naphthophila* hanno mostrato rispettivamente produttività finali di 0.407 mmol  $H_2$ /l/h e 0.311 mmol  $H_2$ /l/h. *T. neapolitana* ha raggiunto le migliori prestaizoni produttive con medium basati sul melasso (1.281 mmol  $H_2$ /l/h), mentre gli altri ceppi hanno raggiunto produttività di sole 0.294 mmol  $H_2$ /l/h (*T. maritima*). Anche in terreni contenti siero di latte *T. neapolitana* ha mostrato una produttività più alta fra i ceppi testati (0.942 mmol  $H_2$ /l/h). In particolare questa produttività è stata più che doppia rispetto a quanto osservato con *T. maritima* (0.415 mmol  $H_2$ /l/h) e *T. petrophila* (0.385 mmol  $H_2$ /l/h) e più di quattro volte quella osservata con *T. naphthophila* (0.207 mmol  $H_2$ /l/h).



**Fig. 3.9 – Produzioni volumetriche di idrogeno ottenute con *Thermotoga* spp. Cresciuto su glucosio, siero di latte e melasso (valori medi su 88-96 h).**

Le produzioni medie di idrogeno dopo 43-44 ore sono ben maggiori e passano da 1.082 a 1.918 mmol H<sub>2</sub>/l/h in *T. neapolitana* su glucosio. Gli altri 3 ceppi hanno mostrato lo stesso comportamento: da 0.311 a 0.606 mmol H<sub>2</sub>/l/h in *T. naphthophila*, da 0.570 a 0.722 mmol H<sub>2</sub>/l/h in *T. maritima*, e da 0.407 a 0.820 mmol H<sub>2</sub>/l/h in *T. petrophila*. Su melasso il passaggio della produzione media da 88 a 44h in *T. neapolitana* è passata da 1.261 to 1.694 mmol H<sub>2</sub>/l/h, *T. naphthophila* da 0.102 a 0.199 mmol H<sub>2</sub>/l/h, *T. maritima* da 0.294 a 0.445 mmol H<sub>2</sub>/l/h, and *T. petrophila* da 0.039 a 0.045 mmol H<sub>2</sub>/l/h. In terreni contenuti siero di latte, *T. neapolitana* ha mostrato cinetiche di consume inferiori se calcolate a 43-44h (0.545 mmol H<sub>2</sub>/l/h) rispetto a 88-96h (0.942 mmol H<sub>2</sub>/l/h). Per quanto riguarda le alter specie invece non si sono osservate differenze.

In conclusione le più alte produzioni volumetriche di idrogeno sono state raggiunte da *T. neapolitana* su terreno contenente glucosio (1.918 mmol H<sub>2</sub>/l/h), tale valore risulta essere il più alto fra i valori ripostati in bibliografia per fermentazioni batch (Tabella 1.6). Una ragione per questo alto valore è imputabile alla maggiore efficienza del sistema tampone.

Anche il valore di produttività volumetrica ottenuta da *T. neapolitana* cresciuto su melasso (1.694 mmol H<sub>2</sub>/l/h) è più alta rispetto a quelle riportate in letteratura (Tabella 1.6). Inoltre *T. neapolitana* è stata anche il miglior microorganismo nell'utilizzazione del siero di latte, con produzioni volumetriche comparabili a quelle riportate in tabella 1.6. Pertanto, sia melasso che siero possono essere impiegati come fonti di carbonio economiche in un efficiente processo di produzione di idrogeno utilizzando cellule sospese di *T. neapolitana*.

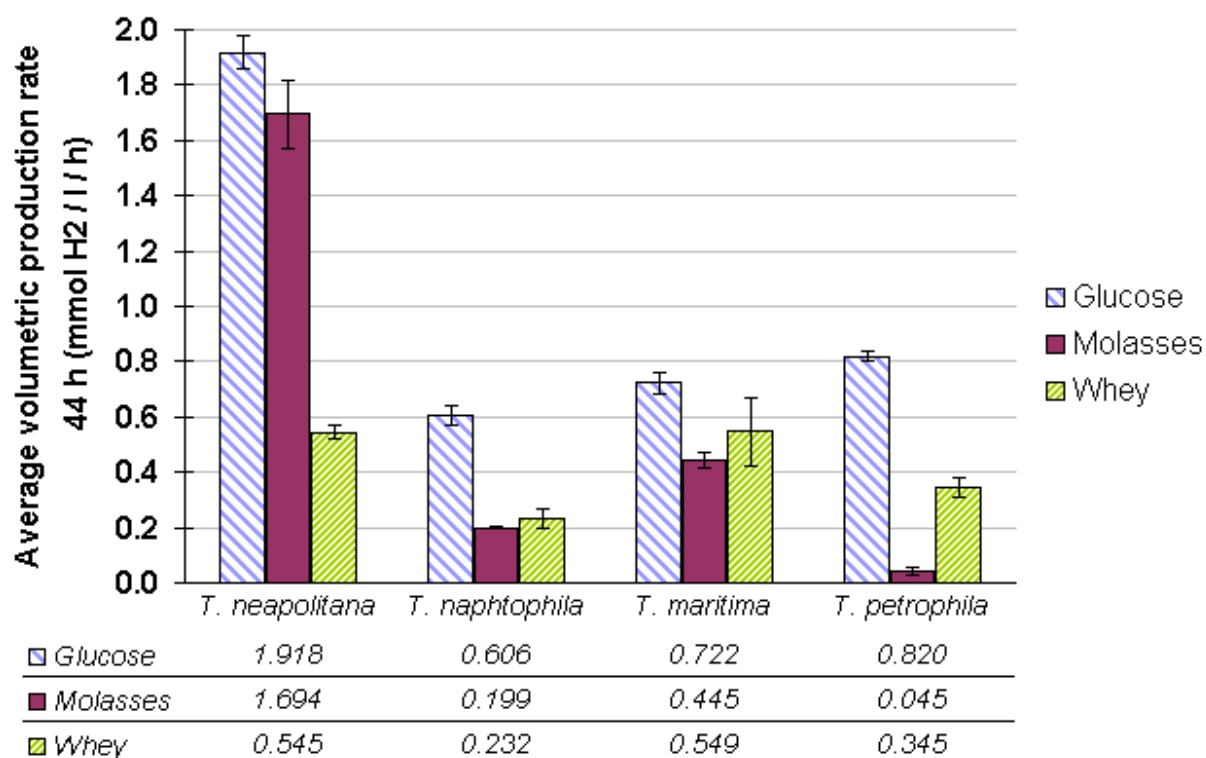


Fig. 3.10 – Velocità volumetriche di produzione idrogeno ottenute con *Thermotoga* spp. Cresciuto su glucosio, siero latte e melasso (valori medi s 43-44 h).

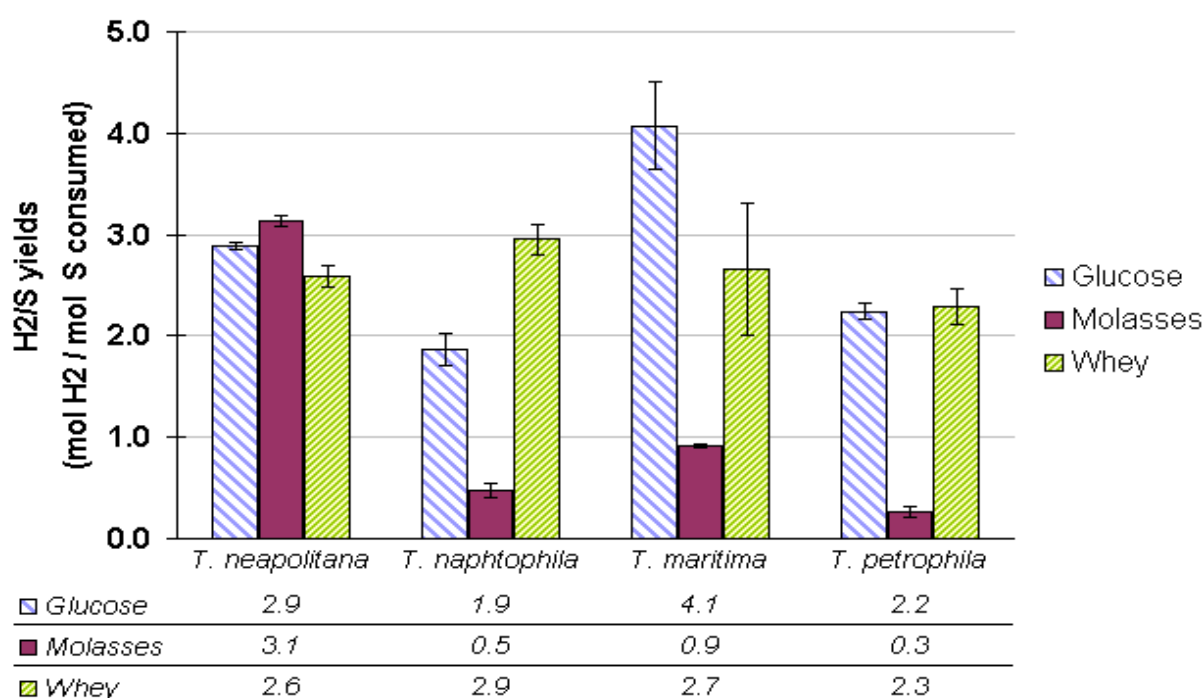
La figura 3.11 mostra le rese di conversione delle moli di substrato consumato in idrogeno durante colture batch dei 4 *Thermotoga* con diverse fonti di carbonio. *T. neapolitana*, ha mostrato un'efficienza di conversione pari a 2.6 H<sub>2</sub>/S su siero di latte, 2.9 H<sub>2</sub>/S su glucosio and 3.1 H<sub>2</sub>/S su melasso.

Nguyen *et al.* (REF) ha riportato valori di 1.84 H<sub>2</sub>/S per *T. neapolitana* su glucosio in colture batch. Questo valore sale a 3.24 H<sub>2</sub>/S in condizioni di flussaggio di azoto, si ipotizza che questo prevenga fenomeni di inibizione da idrogeno. In conclusione i valori sperimentali ottenuti sono confrontabili con i valori riscontrati in letteratura. Nel nostro caso inoltre non è stato performato alcun flussaggio dello spazio di testa e la concentrazione di idrogeno nello spazio di testa è stato del 60%. In conclusione i medium utilizzati per *T. maritima*, *T. petrophila*, e *T. naphthophila* potrebbe non essere il migliore per la produzione per la produzione di idrogeno. Altri studi (Tabella 1.6) hanno dato rese H<sub>2</sub>/S di 3.8 con *T. neapolitana* su glucosio ma le produzioni volumetriche furono al Massimo di 0.97 mmol H<sub>2</sub>/l/h contro 1.918 mmol H<sub>2</sub>/l/h .

I carboidrati presenti nel melasso sono stati convertiti in idrogeno da tutti i ceppi di *Thermotoga*. Il melasso è stato quindi convertito da *T. neapolitana* (3.1 H<sub>2</sub>/S); mentre le rese ottenute dagli altri ceppi sono state inferiori a 1.0 H<sub>2</sub>/S con *T. maritima*, *T. naphthophila* e *T. petrophila*, 0.9 H<sub>2</sub>/S, 0.5 H<sub>2</sub>/S, e 0.3 H<sub>2</sub>/S, rispettivamente. I dati ottenuti con *T. neapolitana* sono in linea con dati di letteratura: la resa H<sub>2</sub>/S è anche maggiore rispetto a quella ottenuta con il glucosio (3.1 contro 2.9). In conclusion *T. neapolitana* è il miglior ceppo testato per la produzione

di idrogeno su melasso in termini di produzioni volumetriche. Esso può quindi essere utilizzato in processi fermentativi aventi efficienze comparabili con quelle viste su terreni contenenti glucosio.

I ceppi di *Thermotoga* hanno dato risultati positivi anche quando inoculati in terreni contenenti siero di latte. Sono state osservate rese di conversione maggiori di 2.0 H<sub>2</sub>/S: 2.3 H<sub>2</sub>/S con *T. petrophila*, 2.6 H<sub>2</sub>/S con *T. neapolitana*, 2.7 con *T. maritima* and 2.9 for *T. naphthophila*. Questi dati, comparabili alle rese di conversione osservate su glucosio sono mediamente più alte rispetto a quelle osservate su melasso. *T. naphthophila* ha inoltre mostrata una maggiore capacità di conversione nei confronti del siero (2.9) rispetto a quanto ha mostrato nei confronti del glucosio (1.9).



**Fig. 3.11 – Rese H<sub>2</sub>/S; I valori sono calcolati come moli di idrogeno prodotte su mole di monosaccaride consumato.**

La formazione di biomassa è stata monitorata e la figura 3.12 mostra i risultati ottenuti. *Thermotoga* ha prodotto 0.1-0.2 g di biomassa secca per grammo di glucosio: *T. neapolitana* 0.2 g/g. Le altre 3 specie invece sono rimaste sotto gli 0.2. Su melasso si è osservata la minore resa media in produzione di biomassa. Culture cresciute su siero di latte hanno evidenziato invece le maggiori produzioni di biomassa fra 0.055 (*T. petrophila*) e 0.494 (*T. naphthophila*) g X/g S.

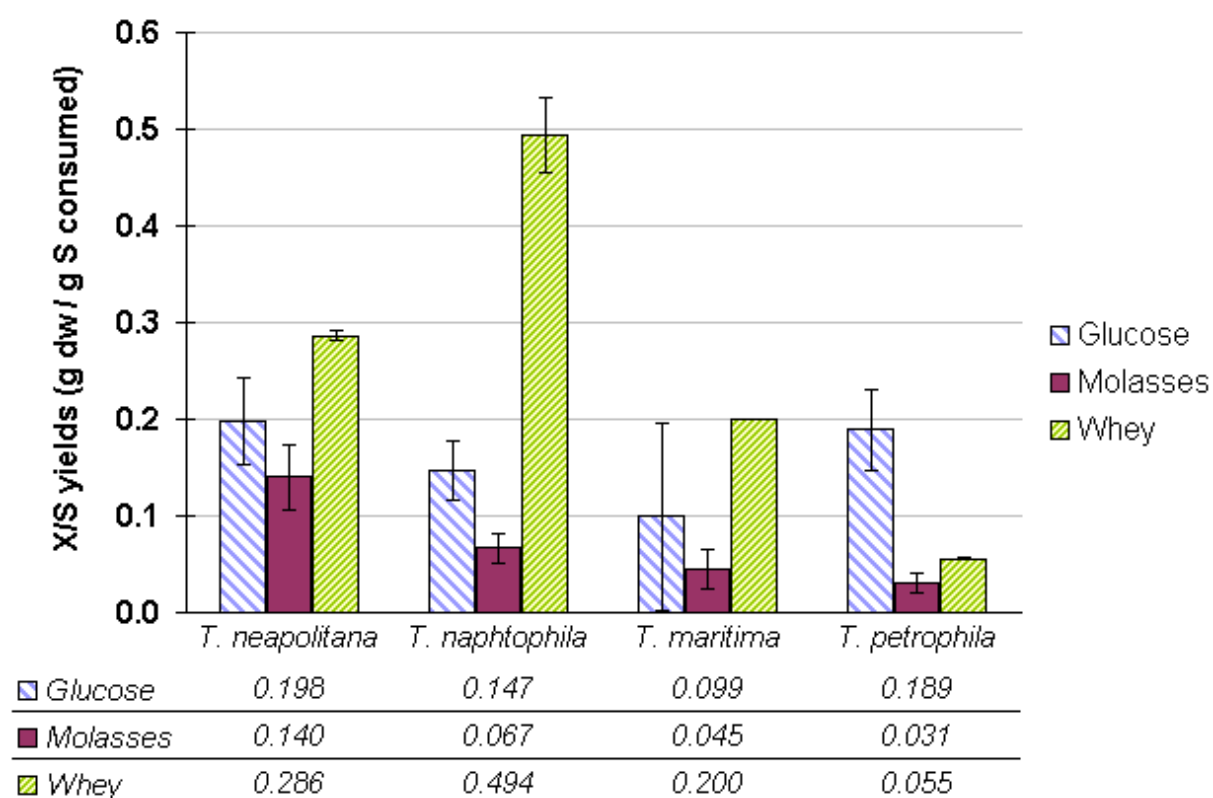


Fig. 3.12 – Rese X/S; I valori sono calcolati come grammi di biomassa su grammo di carboidrati consumati

### 3.5 SELEZIONE DEL SUPPORTO PER LA FORMAZIONE DI BIOFILM E LA PRODUZIONE DI IDROGENO

I test con cellule immobilizzate sono stati descritti nel capitolo Materiali e Metodi. Gli esperimenti così condotti hanno durata di 3-4 ore e per questo solo 4-5 punti sono disponibili (momento zero più un punto dopo ogni ora). La regressione lineare dei dati ha restituito un  $R^2$  maggiore di 0.95, per questo un'interpolazione lineare può essere considerata capace di fittare correttamente con i dati sperimentali. La biomassa sospesa raccolta al termine di ogni prova è stata inferiore al 2.5% della biomassa adesa quindi il loro contributo alla produzione di idrogeno può essere considerata ininfluyente. La biomassa adesa analizzata al termine delle prove si è attestata essere circa un 125% della biomassa adesa iniziale quindi possiamo assumere che la biomassa è rimasta costante durante ogni prova.

La prima parte dell'esperimento è stato condotto al fine di comparare i supporti porosi in base alla loro effettiva capacità di stimolare la formazione di biofilm e la produzione di idrogeno con *T. neapolitana*. I quattro supporti porosi testati sono caratterizzati da dimensioni piuttosto ridotte (0.3 – 1 cm) e da un'elevata porosità e le dimensioni dei pori risultano ottimali per la formazione di biofilm. La Figura 3.13 mostra la produzione di idrogeno nel tempo. *T. neapolitana* ha raggiunto le massime produzioni adeso al supporto Biomax.

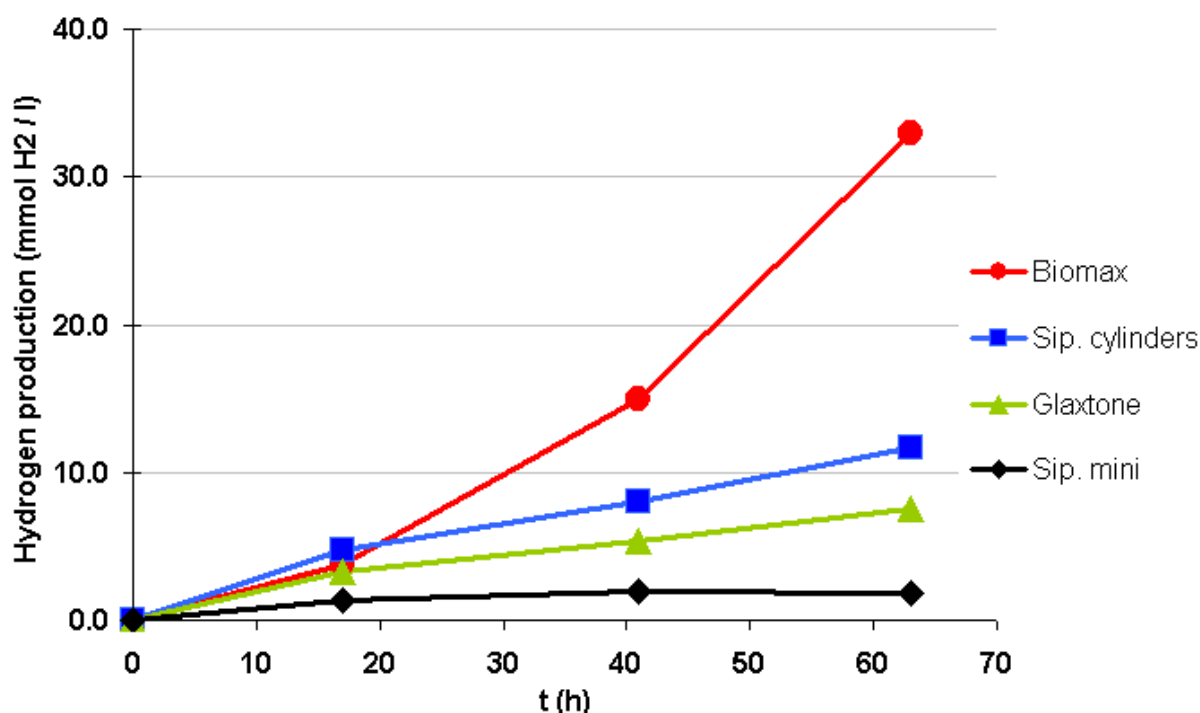


Fig. 3.13 – Produzione di idrogeno in colture batch con 40mL di supporti, fase di crescita cellulare

Successivamente la biomassa adesa è stata misurata e sono state calcolate le produzioni volumetriche e le velocità specifiche di produzione idrogeno. (Figura 3.14 e 3.15). Le velocità di

produzione volumetrica su Biomax, Glaxtone, Siporax cilindri and Siporax mini sono state rispettivamente di 1.354 mmol H<sub>2</sub>/l/h, 0.422 mmol H<sub>2</sub>/l/h, 0.289 mmol H<sub>2</sub>/l/h, and 0.012 mmol H<sub>2</sub>/l/h. La velocità di produzione volumetrica di *T. neapolitana* adeso su Biomax è stata 3 volte più alta rispetto a quanto osservato su Glaxtone, Siporax cylinders, and Siporax mini.

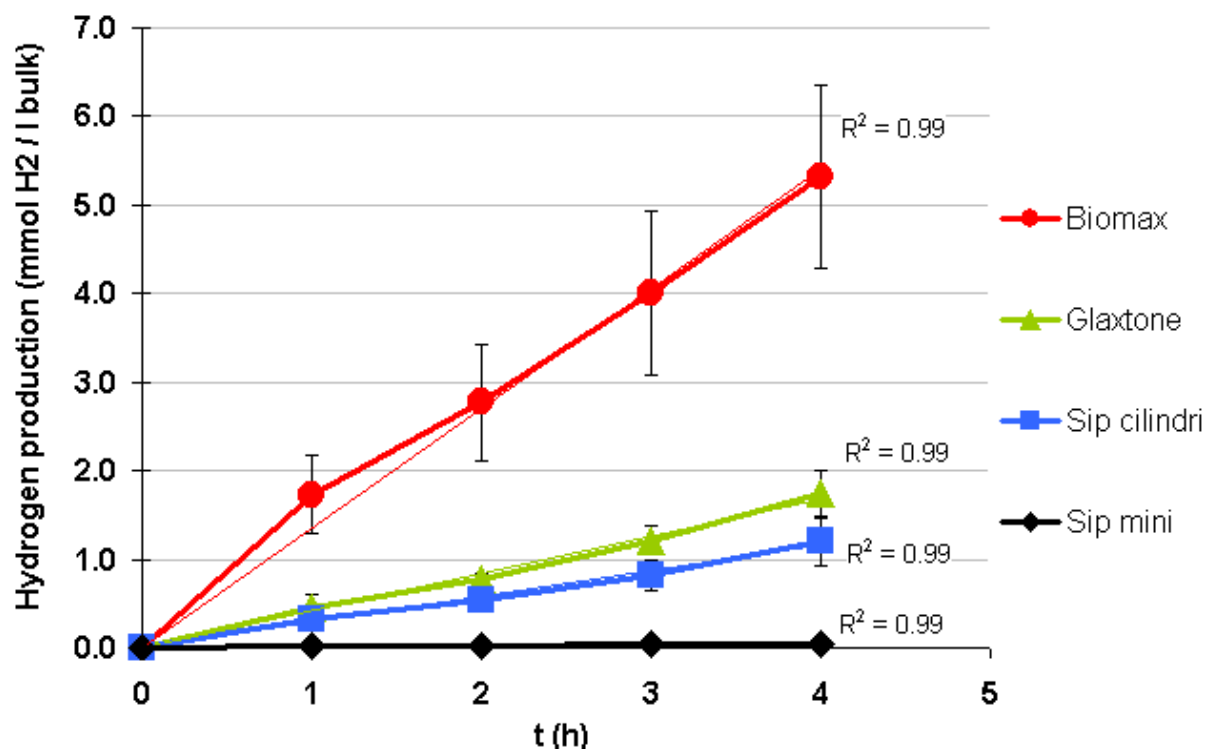


Fig. 3.14 – Produzione di idrogeno in colture batch di *T. neapolitana* a biomassa adesa sui diversi supporti, seconda fase dell'esperimento (4 ore).

La concentrazione della biomassa adesa di *T. neapolitana* su Biomax è stata di 10.5 g/l, due volte maggiore rispetto a quella su Siporax cylinders (5.2 g/l) e Glaxtone (5.3 g/l), e al contempo superiore a quella su Siporax mini (8.3 g/l). Per questo motivo siamo certi che Biomax ha permesso la formazione di una maggiore concentrazione cellulare adesa ad esso e quindi un migliore biofilm.

Velocità specifiche di produzione sono state calcolate per *T. neapolitana* su ogni supporto: 3.083 mmol H<sub>2</sub>/g X/giorno su Biomax, 1.948 mmol H<sub>2</sub>/g peso secco/d su Glaxtone, 1.303 mmol H<sub>2</sub>/g peso secco/d su Siporax Cylinders, e 0.035 mmol H<sub>2</sub>/g peso secco/d su Siporax mini. La velocità specifica di produzione idrogeno con *T. neapolitana* su Biomax (3.083 mmol H<sub>2</sub>/g peso secco/d) è la maggiore osservata.



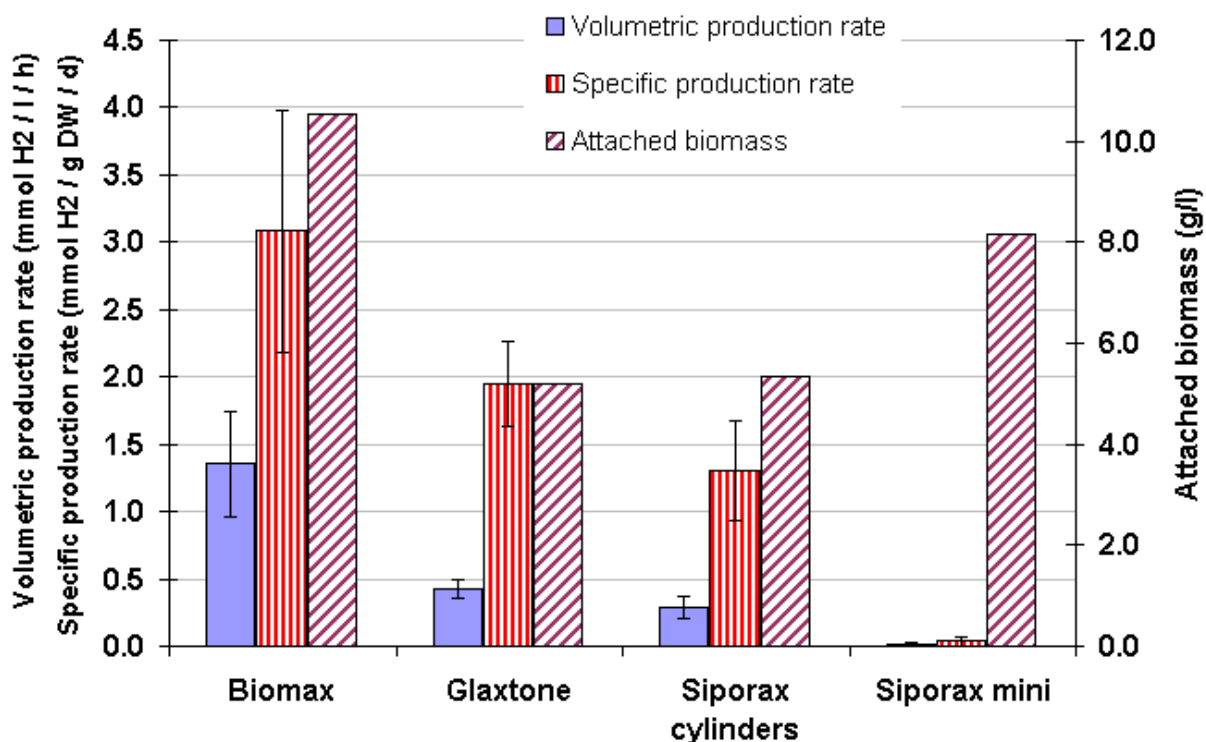


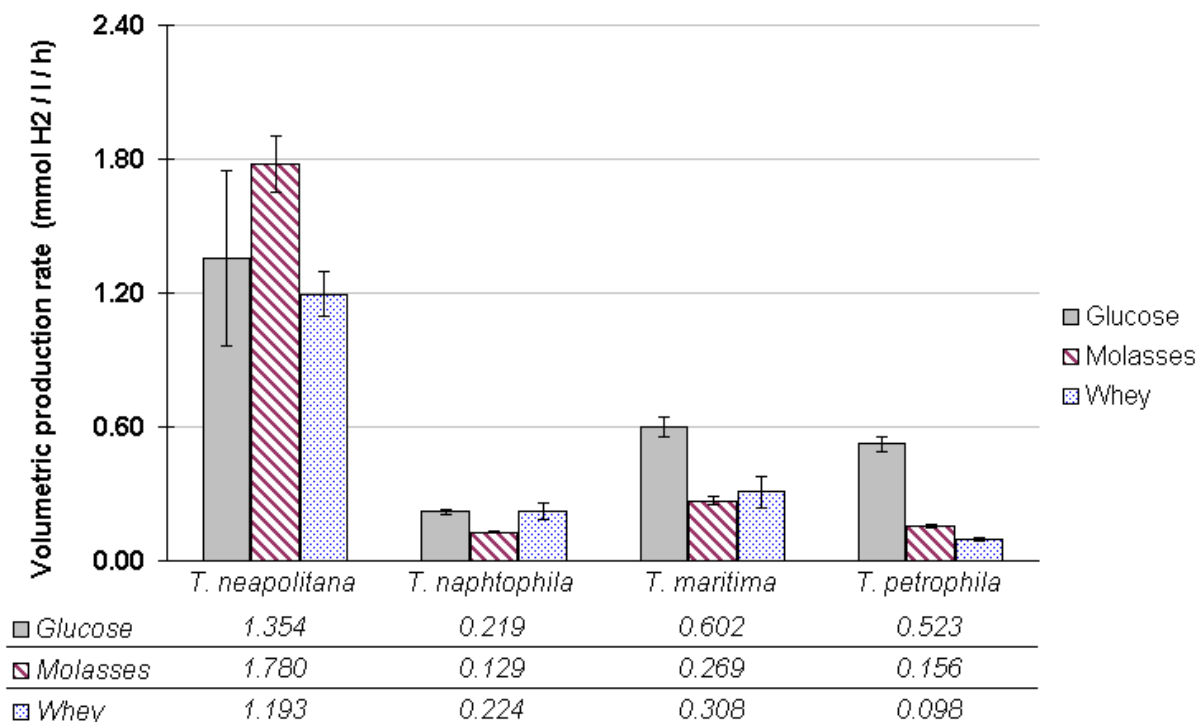
Fig. 3.15 – Confronto dei supporti porosi in termini di velocità volumetrica, velocità specifica e quantità di biomassa adesa.

In conclusione possiamo dire che è stato dimostrato che *T. neapolitana* adeso su Biomax ha ottenuto i migliori risultati in termini di biomassa adesa totale, velocità volumetrica di produzione idrogeno e velocità specifica di produzione idrogeno.

Ulteriore considerazione è che Biomax è l'unico supporto di materiale ceramico mentre gli altri sono in vetro sinterizzato. La composizione chimica le caratteristiche fisiche (dimensioni pori, e porosità) permettono a Biomax di primeggiare. Biomax è stato quindi selezionato come supporto per i successivi test di produzione idrogeno con *Thermotoga*.

### 3.6 PRODUZIONE D'IDROGENO CON COLTURE DI *THERMOTOGA* A BIOMASSA ADESA CRESCIUTE SU GLUCOSIO, MELASSO E SIERO DI LATTE

In questo capitolo analizziamo e confrontiamo le produzioni in termini di idrogeno da parte dei 4 biofilm dei ceppi di *Thermotoga* (*T. neapolitana*, *T. maritima*, *T. naphthophila* and *T. petrophila*) adesi al supporto Biomax utilizzando i tre substrati in analisi (Glucosio, Melasso, siero di latte). La Fig. 3.16 riassume le velocità volumetriche di produzione H<sub>2</sub> da parte dei 4 ceppi. *T. neapolitana* (1.354 mmol H<sub>2</sub>/l/h) ha dato risultati due volte maggiori rispetto a quanto osservato con *T. maritima* (0.602 mmol H<sub>2</sub>/l/h) e *T. petrophila* (0.523 mmol H<sub>2</sub>/l/h), mentre sono stati sei volte superiori a quanto osservato con *T. naphthophila* (0.219 mmol H<sub>2</sub>/l/h). *T. neapolitana* ha inoltre mostrato le maggiori velocità volumetriche di produzione H<sub>2</sub> su terreno in cui il glucosio è stato sostituito dal melasso (1.780 mmol H<sub>2</sub>/l/h). Gli altri tre ceppi su melasso hanno restituito al massimo 0.269 mmol H<sub>2</sub>/l/h (*T. maritima*). Anche su siero di latte *T. neapolitana* (1.193 mmol H<sub>2</sub>/l/h) ha mostrato la più alta velocità volumetrica fra tutti i ceppi testati: *T. maritima* (0.308 mmol H<sub>2</sub>/l/h), *T. petrophila* (0.224 mmol H<sub>2</sub>/l/h) e *T. naphthophila* (0.098 mmol H<sub>2</sub>/l/h).



**Fig. 3.16 – Velocità volumetriche di produzione di idrogeno ottenute con *Thermotoga* spp. Cresciuto su glucosio, siero di latte e melasso.**

Dalla quantificazione della biomassa è risultato che la sua concentrazione è stata maggiore nei terreni contenenti melasso e siero di latte (figure 4.15). Su glucosio, melasso e siero di latte *T. maritima* ha raggiunto la massima concentrazione cellulare fra i ceppi testati ottenendo i seguenti valori: 10.2 g/l, 12.0 g/l e 13.0 g/l, rispettivamente. Biomass concentrations measured among the four microorganisms vary from 6.6 g dw/l to 13.0 g dw/l.

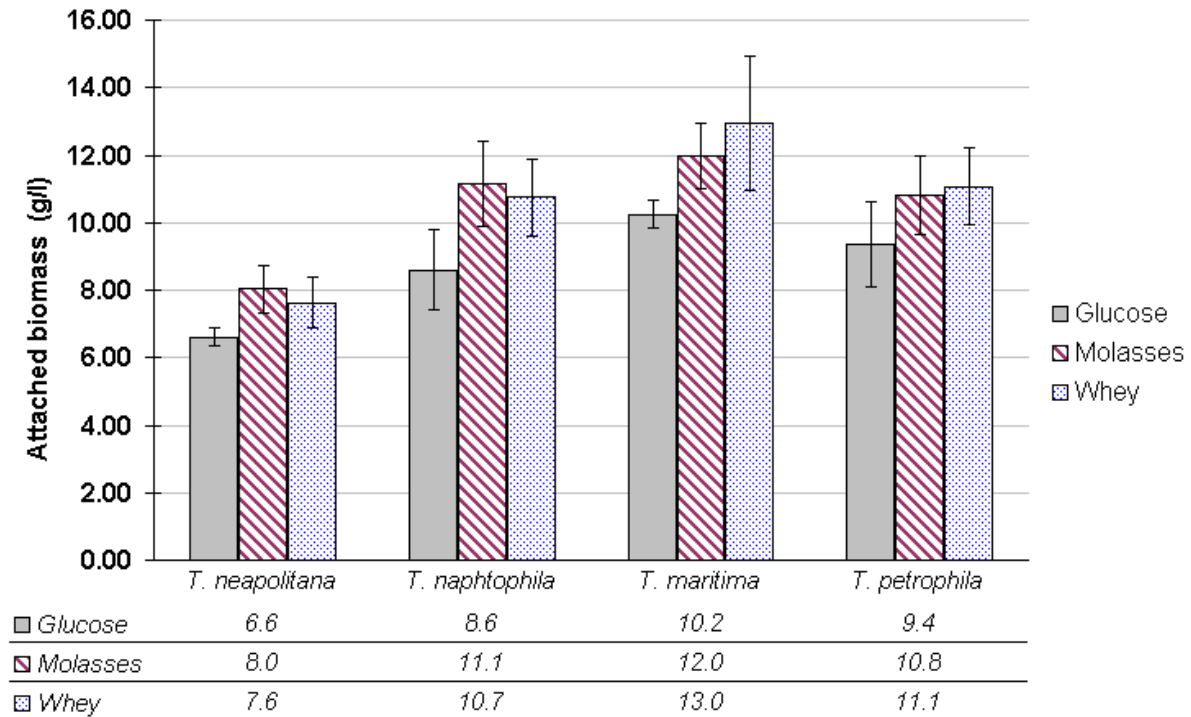
La velocità volumetrica di produzione è stata normalizzata per la quantità di biomassa adesa e in questo modo abbiamo valutato la velocità specifica di produzione di idrogeno (Fig. 3.17). *T. neapolitana* ha dato i risultati migliori. Su glucosio: 3.083 mmol H<sub>2</sub>/g dw/d (*T. neapolitana*), 1.412 mmol H<sub>2</sub>/g dw/d (*T. maritima*) 1.366 mmol H<sub>2</sub>/g dw/d (*T. petrophila*), and 0.686 mmol H<sub>2</sub>/g dw/d (*T. naphthophila*). Anche su melasso e siero di latte *T. neapolitana* ha mostrato velocità di produzione specifica superiori: 5.329 mmol H<sub>2</sub>/g dw/d e 3.792 mmol H<sub>2</sub>/g dw/d rispettivamente.

Tutti i valori di velocità specifica riportati in figura 3.17 sono compatibili con quelli riportati in letteratura (Tabella 1.6), il glucosio è stato convertito in glucosio con buoni valori di velocità da parte di tutti i ceppi *Thermotoga*. La velocità specifica di *T. neapolitana* cresciuto su melasso (5.329 mmol H<sub>2</sub>/g dw/d) è stata almeno dieci volte superiore rispetto a quanto osservato con gli altri 3 ceppi. Questo porta a considerare che i carboidrati presenti nel melasso non sono completamente fermentati dai metabolismi *T. maritima*, *T. naphthophila* e *T. petrophila*. Solo *T. neapolitana* ha poi raggiunto alte velocità di produzione idrogeno su siero di latte (3.792 mmol H<sub>2</sub>/g dw/d, 1.193 mmol H<sub>2</sub>/l/h). Colture sospese di *T. maritima*, *T. naphthophila* e *T. petrophila* su siero di latte avevano mostrato velocità di produzione idrogeno simili a quelle osservate con *T. neapolitana*. Invece, con biomassa adesa, abbiamo assistito a velocità specifiche da parte di *T. maritima*, *T. naphthophila* e *T. petrophila* di circa un 15% rispetto a quanto osservato con *T. neapolitana*.

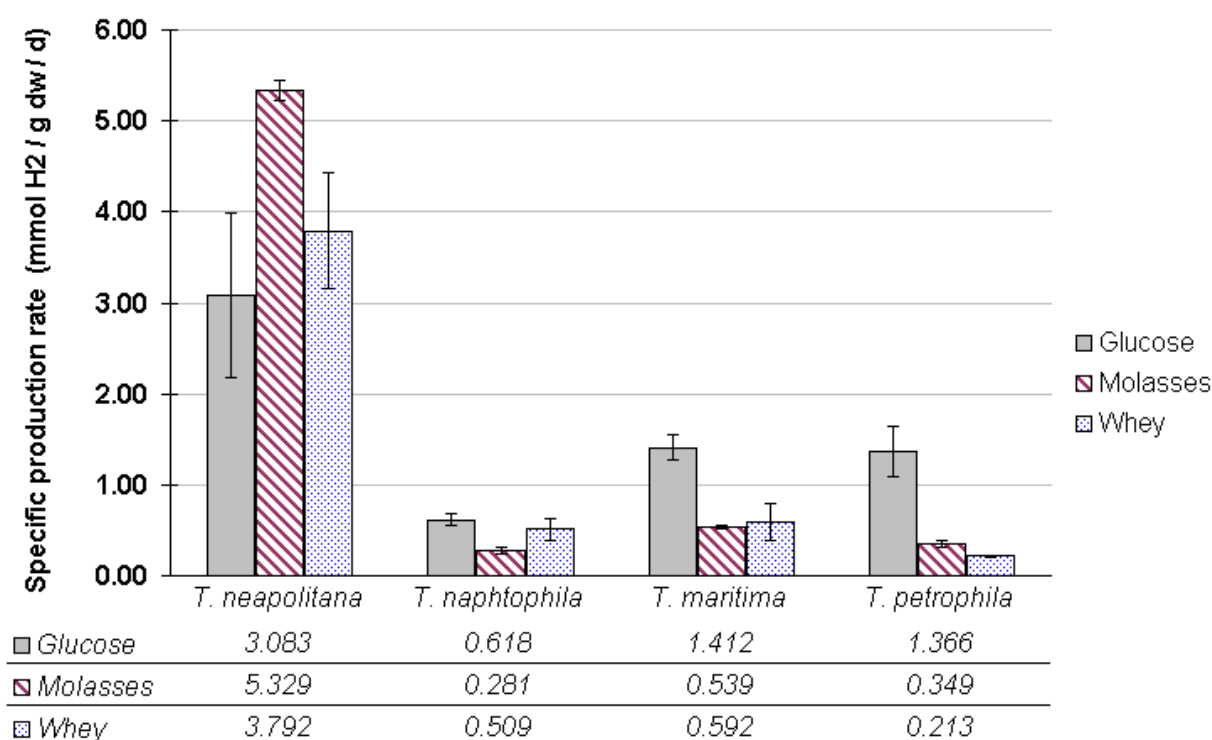
I valori di produttività volumetrica su glucosio, melasso e siero con *T. neapolitana* sono stati di 1.354 mmol H<sub>2</sub>/l/h, 1.780 mmol H<sub>2</sub>/l/h, e 1.193 mmol H<sub>2</sub>/l/h, rispettivamente. Tutti questi valori sono superiori a quanto riportato in letteratura per la produzione di idrogeno in colture batch (Tabella 1.6). Questi risultato sono probabilmente derivanti dall'utilizzo di un buffer migliore e dall'impiego di un supporto (Biomax) sul quale è possibile raggiungere concentrazioni cellulari superiori rispetto a quelli con coltura sospesa. Come osservato nelle colture a biomassa sospesa anche con biomassa adesa *T. neapolitana* è la specie migliore di *Thermotoga* fra le 4 testate in base alla conversione dei carboidrati presenti nei terreni di coltura.

La procedura adottata per la conduzione dell'esperimento con biomassa adesa, e quindi il passaggio di lavaggio dei supporti con soluzione salina, ha il doppio vantaggio di eliminare la biomassa non realmente adesa ma anche di ridurre sensibilmente i fenomeni di inibizione da prodotto sia da idrogeno che da acidi organici. Inoltre gli esperimenti di questo tipo sono stati condotti in lassi di tempo ridotti (3 – 4 h) e una trascurabile formazione di nuova biomassa sospesa. La biomassa adesa iniziale è stata valutata campionando 5 supporti dopo la fase di lavaggio. Anche se questa operazione è stata condotta velocemente in alcuni secondi e sotto flussaggio di azoto non è possibile confermare che la biomassa non sia stata esposta all'ossigeno. Per

questo motivo, vista la sensibilità delle deidrogenasi all'ossigeno, è possibile che i valori qui riportati sia in velocità specifiche siano sottostimati rispetto. Biomax è caratterizzato da elevate volume vuoti che favoriscono l'assorbimento di material organico presente nel terreno, specialmente con il siero di latte che è ricco in proteine. Un accurato bilancio del carbonio dovrebbe essere condotto al fine di confermare i risultati ottenuti.



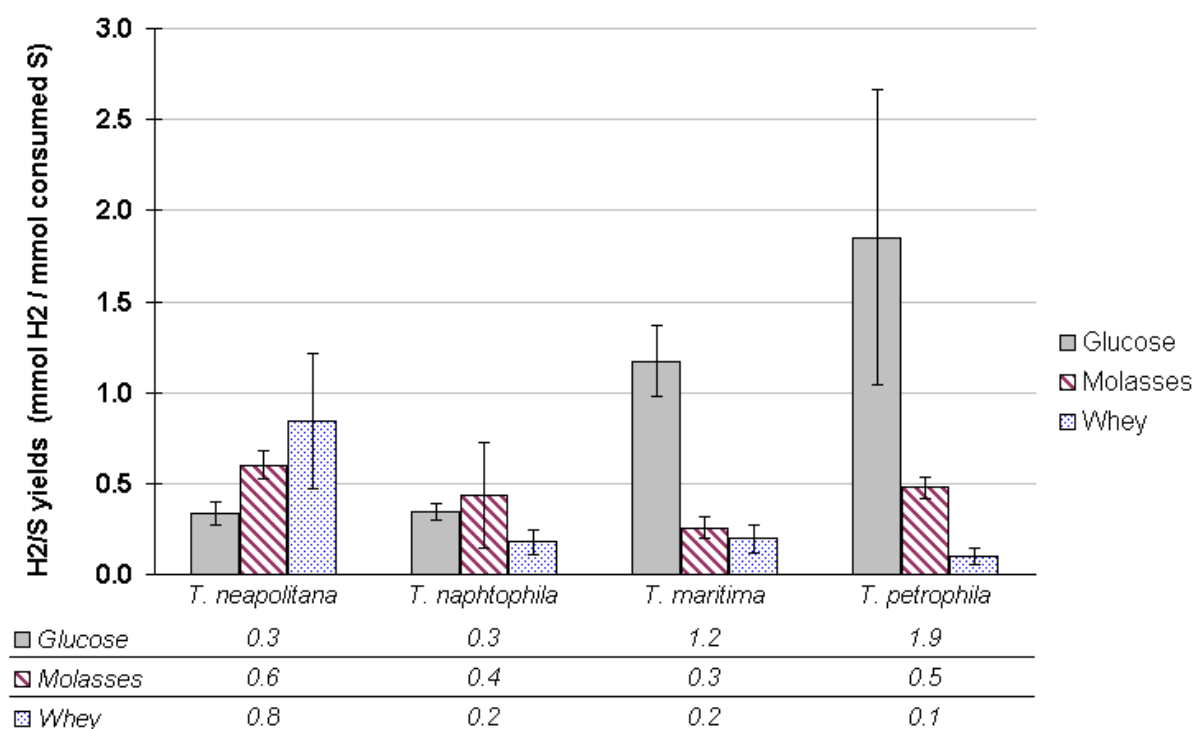
**Fig. 3.17 – Biomassa adesa dei diversi ceppi di *Thermotoga* cresciuti su Biomax utilizzando glucosio, siero di latte e melasso. Valori sono espresso in g di sostanza secca.**



**Fig. 3.17 – Velocità volumetrica specifica di idrogeno per i ceppi *Thermotoga* cresciuti su glucosio, siero di latte e melasso.**

La resa di conversione  $H_2/S$  è stata calcolata. La Figura 3.18 riassume le rese espresse in mol  $H_2$ / mol S calcolate sulle colture batch dei quattro ceppi di *Thermotoga* cresciuti a biomassa adesiva: su glucosio, melasso e siero di latte. Mediamente le rese  $H_2/S$  sono state di c.ca 0.3-0.8. Su glucosio, con *T. maritima* e *T. petrophila* sono state osservate rese superiori a 1.0 (1.2 mol  $H_2$ /mol S consumato e 1.9 mol  $H_2$ /mol S consumato, rispettivamente). I carboidrati forniti dal melasso sono stati convertiti con rese comprese fra 0.3 e 0.6 mol  $H_2$ /mol S consumato. *T. neapolitana* ha mostrato le maggiori rese  $H_2/S$  su siero di latte (0.8 mol  $H_2$ /mol S consumato). Gli altri 3 ceppi hanno raggiunto rese fra 0.1-0.2 mol  $H_2$ /mol S consumato.

Le rese  $H_2/S$  calcolate per esperimenti a biomassa adesiva sono state significativamente inferiori rispetto a quelle su test a biomassa sospesa. Nessun dato è disponibile in letteratura in merito alla produzione di idrogeno da *Thermotoga* in colture a biomassa adesiva; perciò queste basse rese potrebbero essere dovute al sistema sperimentale adottato o alle caratteristiche del biofilm di *Thermotoga*.



**Fig. 3.18 – Rese  $H_2/S$ ; I valori sono calcolati come moli di idrogeno prodotto per mole di monosaccaride consumato.**

In conclusione l'intero set di analisi indica che fra i 4 ceppi testati *T. neapolitana* è il più efficiente in termini di velocità di produzione di idrogeno e in rese di conversione su ogni substrato testato.

### 3.7 MINIMIZZAZIONE DEL TERRENO DI COLTURA PER LA PRODUZIONE DI IDROGENO

In questo capitolo mostriamo la procedura di minimizzazione del terreno di coltura svolta al fine di renderlo più economico pur mantenendo un buon compromesso fra economicità, velocità di produzione e rese da parte di *T. neapolitana* (il microorganismo selezionato durante i test mostrati precedentemente) sia su melasso che su siero di latte. In prima istanza la fonte di carbonio originale del terreno modATCC 1977 è stato sostituito con melasso o con siero di latte e successivamente i maggiori componenti del terreno (microelements, vitamins, TSB, YE, and cysteine) sono stati tolti passo dopo passo.

## Siero di latte

La composizione chimica del siero di latte utilizzato per i test condotti con modATCC 1977 è descritta nel capitolo materiali e metodi. Idrogeno, anidride carbonica, biomassa e produzione di acetato da *T. neapolitana* su WCM sono riassunti in Tabella 3.1. Le produzioni di idrogeno nel tempo con *T. neapolitana* con i modATCC 1977 più rappresentativi sono riassunte in figura 3.19.

**Tab. 3.1 – Idrogeno, anidride carbonica, acetate, e produzione di biomassa con *T. neapolitana* sui diversi modATCC 1977 medium testati durante la minimizzazione con siero di latte. WCM, terreno completo con siero; WMM, terreno minimo con siero; WMMT, terreno minimo con siero e TSB; w/o, senza.**

	Total mmol H <sub>2</sub>	mmol H <sub>2</sub> / l	Total mmol CO <sub>2</sub>	Total mmol acet.	H <sub>2</sub> /S yield (mmol H <sub>2</sub> /mol S consumed)	CO <sub>2</sub> /S yield (mmol CO <sub>2</sub> /mol S consumed)	X/S yield (g dw/g S consumed)	H <sub>2</sub> / CO <sub>2</sub> ratio	H <sub>2</sub> / acet. ratio
<b>WCM</b>	<b>3.770</b>	<b>94.3</b>	<b>2.664</b>	<b>1.618</b>	<b>2.59</b>	<b>1.67</b>	<b>0.262</b>	<b>1.55</b>	<b>2.33</b>
<b>WCM w/o micro- elements</b>	2.828	70.7	2.106	1.429	2.51	1.53	0.224	1.64	1.98
<b>WCM w/o vitamins</b>	3.539	88.5	2.659	1.519	2.29	1.58	0.209	1.45	2.33
<b>WCM w/o TSB</b>	2.616	65.4	1.939	1.315	1.40	0.80	0.172	1.75	1.99
<b>WCM w/o YE</b>	3.956	98.9	2.692	1.433	2.69	1.65	0.147	1.63	2.76
<b>WMM with micro- elements</b>	2.943	73.6	1.504	1.168	1.96	1.01	0.118	1.95	2.52
<b>WMM with vitamins</b>	0.421	10.5	0.233	1.859	0.30	0.16	0.014	1.80	0.23
<b>WMM with YE</b>	2.662	66.6	1.456	1.242	1.50	0.82	0.250	1.83	2.14
<b>WMM with TSB (WMMT)</b>	<b>3.035</b>	<b>75.9</b>	<b>1.728</b>	<b>1.611</b>	<b>2.20</b>	<b>1.25</b>	<b>0.221</b>	<b>1.76</b>	<b>1.88</b>
<b>WMM</b>	1.998	50.0	1.704	1.341	1.89	1.62	0.227	1.17	1.49

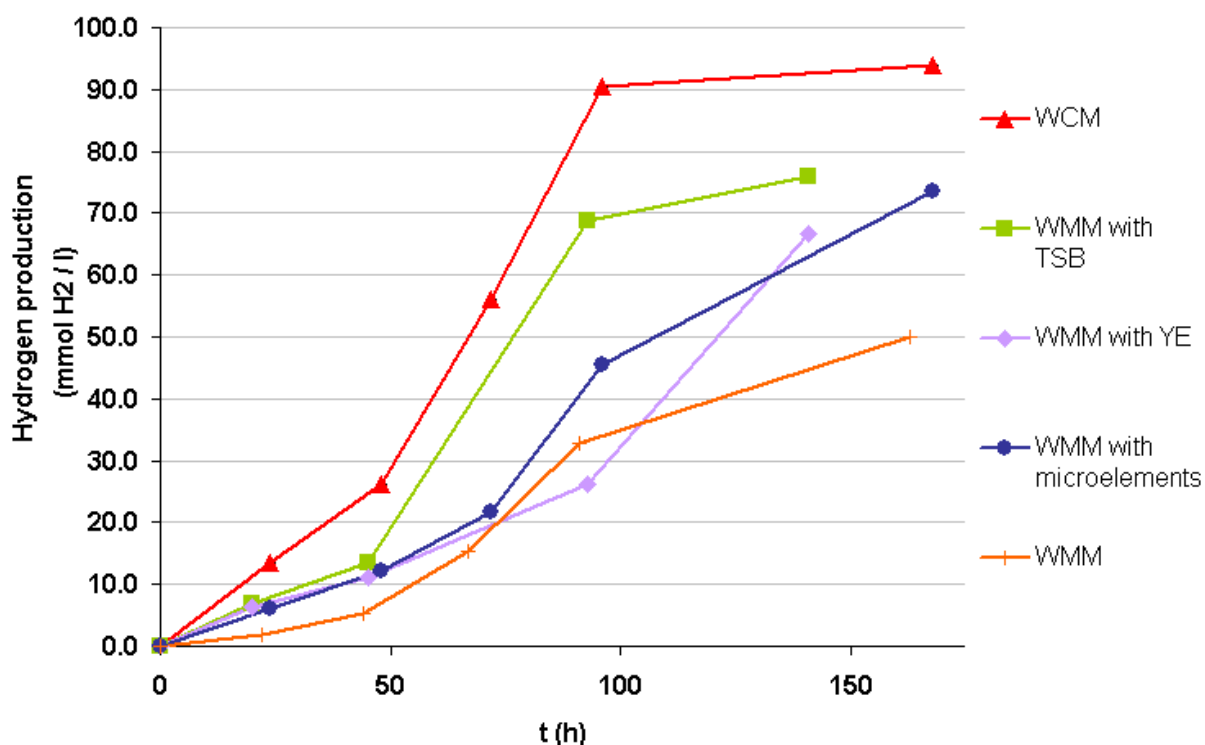


Fig.

3.19 – Produzione di idrogeno nel tempo per alcune versioni di ATCC 1977 su siero di latte. WCM, terreno complete con siero di latte; WMM, terreno minimo con siero di latte; TSB, brood di estratto di soia; YE, estratto di lievito.

Il terreno modATCC 1977 con siero 12.5 g/l (WCM) è stato testato e *T. neapolitana* ha prodotto efficientemente idrogeno quando cresciuto su questo medium (94.7 mmol H<sub>2</sub>/l). I macroelementi che includono NH<sub>4</sub>Cl come fonte inorganica di azoto, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> come fonte di fosfato e NaCl per regolare la pressione osmotica, sono stati considerati essenziali per la crescita microbica. Aspetto interessante è stato che nessuno dei principali componenti del terreno (vitamine, microelementi, TSB e YE) è stato osservato essere essenziale per la produzione di idrogeno con *T. neapolitana* su terreno avente come fonte di carbonio il siero di latte. Infatti questi composti sono stati eliminati uno a uno dal medium WCM e la produzione di idrogeno è rimasta nello stesso ordine di grandezza (65.4-98.9 mmol H<sub>2</sub>/l). Molto probabilmente il siero fornisce proteine, vitamine e microelementi, ad ogni modo, l'eliminazione del TSB determina una riduzione da 94.3 mmol H<sub>2</sub>/l a 65.4 mmol H<sub>2</sub>/l. Inoltre, la produttività totale di *T. neapolitana* diminuisce fino a 50.0 mmol H<sub>2</sub>/l nel WMM, dove tutti i 4 componenti sono stati eliminati contemporaneamente. La riaggiunta di TSB al WMM medium (WMMT) è risultata essere la migliore combinazione fra quelle testate in termini di produttività (75.9 mmol H<sub>2</sub>/l) e resa H<sub>2</sub>/S (2.20 moles of H<sub>2</sub> /mol di monosaccaride consumato). WMMT medium è costituito esclusivamente da macronutrienti, una fonte di carbonio economica, un agente riducente e HEPES come buffer. In conclusione WMMT medium è stato selezionato come terreno minimo a base di siero per le successive prove batch e su reattore.

Le rese H<sub>2</sub>/S su siero di latte sono state al 50 % della resa teorica massima di 4 moli of H<sub>2</sub> per mole di monosaccaride. Analisi HPLC hanno evidenziato un residuo abbastanza alto di galattosio (3-4 g/l). Questo fa pensare ad una bassa affinità di *T. neapolitana* nei confronti di



galattosio, i valori finali di pH sono risultati essere superiori a 6.5, quindi non si sono raggiunti valori inibitori. Altre possibili cause sono (i) inibizione da prodotto svolta da elevate concentrazioni di idrogeno nello spazio di testa, (ii) inibizione da prodotto svolta da alte concentrazioni di acidi organici o altri prodotti di fermentazione non rilevati (iii) un inappropriato rapporto C/N o C/P nel WMMT medium. Quindi, sono necessari altri sforzi per raggiungere la complete conversione dei carboidrati presenti nel siero di latte al fine di incrementare la produttività volumetriche.

I rapporti  $H_2/CO_2$  sono sempre risultati compatibili con il valore teorico di 2 moli di idrogeno per mole di anidride carbonica. Le concentrazioni calcolate comunque sono state inferiori rispetto a quelle attese, questo principalmente per la solubilità della  $CO_2$  nel medium. Il carbonato solubilizzabile infatti dipende dal pH, a pH basico un grande quantitativo di  $CO_2$  è in soluzione sotto forma di acido carbonico e anioni. In conclusione, la  $CO_2$  non quantificata non è utilizzabile per un corretto bilancio del carbonio. I rapporti  $H_2$ /acetato sono stati leggermente superiori rispetto a quanto atteso.

Abbiamo valutato la possibilità di sostituire l'agente riducente cisteina con MBS a diverse concentrazioni (Tabella 3.2). Sono state confrontate cisteina 2g/L con MBS a diverse concentrazioni e l'assenza di agente riducente. In assenza di cisteina la produttività di idrogeno da *T. neapolitana* è passata da 90.5 mmol  $H_2$ /l a 5.6 mmol  $H_2$ /l. L'aggiunta di metabisolfito (MBS) ha permesso a *T. neapolitana* di produrre idrogeno. I migliori risultati si sono conseguiti utilizzando MBS a 0.25 g/l: 46.4 mmol  $H_2$ /l e resa  $H_2$ /S di 1.12 moli  $H_2$ /mol glucosio consumato. La  $CO_2$  e l'acetato sono stati prodotti stechiometricamente in accordo con la reazione di conversione del glucosio.

**Tab. 3.2 – Idrogeno, anidride carbonica, acetato e produzione di biomassa con *T. neapolitana* sui terreni con diversi agenti riducenti e diverse concentrazioni.**

	Total mmol $H_2$	mmol $H_2$ / l	Total mmol $CO_2$	Total mmol acet.	$H_2$ /S yield (mmol $H_2$ /mol S consumed)	$CO_2$ /S yield (mmol $CO_2$ /mol S consumed)	X/S yield (g dw/ g S consumed)	$H_2$ / $CO_2$ ratio	$H_2$ / acet. Ratio
<b>WMM with TSB (WMMT)</b>	<b>3.620</b>	<b>90.5</b>	<b>2.243</b>	<b>1.630</b>	<b>2.64</b>	<b>1.63</b>	<b>0.062</b>	<b>1.61</b>	<b>2.22</b>
<b>WMM</b>	1.998	50.0	1.704	1.341	1.89	1.62	0.068	1.17	1.49
<b>WMMT w/o Cys + MBS 0,05 gL</b>	1.656	41.4	1.088	1.570	0.88	0.58	0.018	1.52	1.06
<b>WMMT w/o Cys + MBS 0,10 gL</b>	1.585	39.6	0.920	1.444	1.12	0.65	0.031	1.72	1.10
<b>WMMT w/o Cys + MBS 0,25 gL</b>	1.855	46.4	1.126	1.109	0.82	0.50	0.013	1.65	1.67
<b>WMMT w/o Cys + MBS 0,50 gL</b>	1.030	25.8	0.640	0.741	0.38	0.24	0.007	1.61	1.39
<b>WMMT w/o Cys</b>	0.222	5.6	0.104	ND	ND	ND	ND	2.13	ND

Concludiamo dicendo che la presenza di un agente riducente è essenziale per la produzione di idrogeno per via fermentativa con *T. neapolitana*. Cisteina 1 g/l ha permesso di raggiungere le migliori performance su WMMT con TSB. La composizione del terreno WMMT con TSB è indicata in tabella 3.3, la concentrazione di siero di latte è pari a 12.5g/L.

**Tab. 3.3 – Composizione WMMT with TSB**

Components	g/L
Hepes	23.8
NaCl	10
NH <sub>4</sub> Cl	0.1
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.7
TSB	2.0
cysteine	1.0

## Melasso

La produzione di idrogeno, di anidride carbonica, biomassa cellulare e acetato da *T. neapolitana* con WCM media vengono riportate in tabella 3.4. La produzione di idrogeno nel tempoda *T. neapolitana* per i terreni più rappresentativi del modATCC 1977 utilizzando melasso come fonte di carbonio sono mostrate in figura 3.20.

**Tab. 3.4 – Idrogeno, anidride carbonica, acetate e produzione di biomassa di *T. neapolitana* su terreni modATCC 1977 modificati per la minimizzazione, melasso come fonte di carbonio.**

	Total mmol H <sub>2</sub>	mmol H <sub>2</sub> / l	Total mmol CO <sub>2</sub>	Total mmol acet.	H <sub>2</sub> /S yield (mmol H <sub>2</sub> /mol S consumed)	CO <sub>2</sub> /S yield (mmol CO <sub>2</sub> /mol S consumed)	X/S yield (g dw/ g S consumed)	H <sub>2</sub> / CO <sub>2</sub> ratio	H <sub>2</sub> / acet. Ratio
<b>MCM</b>	<b>4.806</b>	<b>120.1</b>	<b>3.175</b>	<b>1.800</b>	<b>3.75</b>	<b>2.38</b>	<b>0.251</b>	<b>1.58</b>	<b>2.67</b>
<b>MCM w/o YE</b>	3.066	76.6	1.087	0.925	2.51	1.05	0.251	2.39	3.31
<b>MCM w/o TSB</b>	3.237	80.9	1.204	1.057	3.24	1.42	0.274	2.27	3.06
<b>MCM w/o micro- elements</b>	3.350	83.7	1.305	1.142	3.03	1.49	0.357	2.04	2.93
<b>MCM w/o vitamins</b>	3.329	83.2	1.278	1.093	3.14	1.48	0.346	2.12	3.04

MMM	3.349	83.7	1.429	1.950	2.90	1.42	0.126	2.04	1.72
-----	-------	------	-------	-------	------	------	-------	------	------

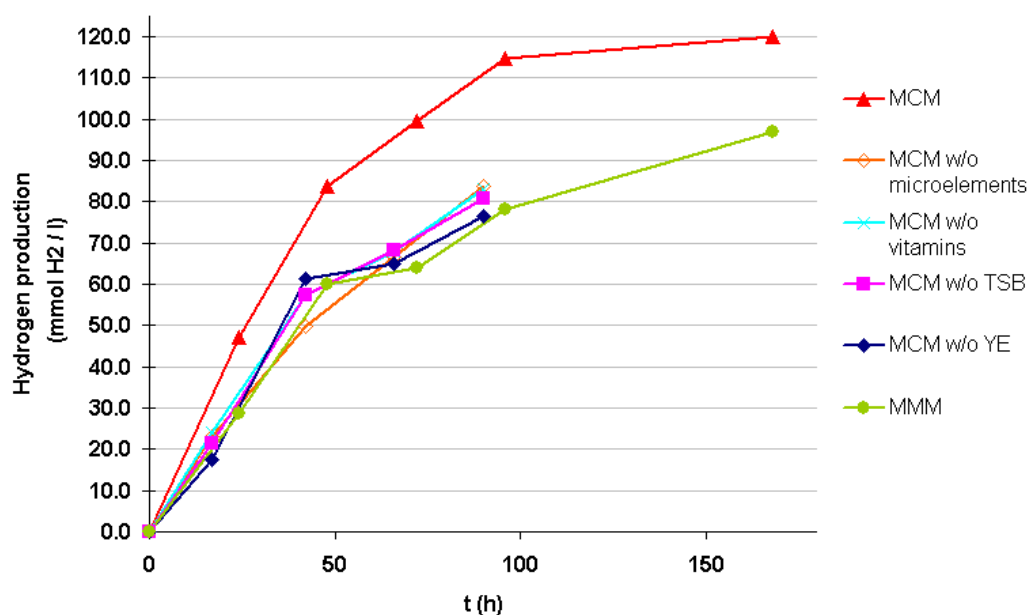


Fig. 3.20 – Produzione di idrogeno nel tempo con ATCC 1977 su melasso. MCM, terreno complete a melasso; MMM, terreno minimo con melasso; TSB, brodo di estratto di soia; YE, estratto di lievito.

Il terreno completo con melasso (MCM medium) è stato testato con buone produzioni di idrogeno con *T. neapolitana* (120 mol  $H_2$ /l). Macroelementi che includono  $NH_4Cl$  come fonte inorganica di azoto,  $K_2HPO_4$  come fonte di fosfato e  $NaCl$  per regolare la pressione osmotica, sono stati considerati essenziali per la crescita microbica, nessuno dei component del terreno (vitamine, microelementi, TSB and YE) è considerabile indispensabile per la produzione fermentativa di idrogeno con *T. neapolitana* su MCM medium. Questi componenti sono stati infatti tolti uno alla volta e le produzioni di idrogeno non sono variate sensibilmente (da 76.6 a 83.7 mol  $H_2$ /l). Il melasso risulta perciò essere in grado di fornire vitamine, microelementi e azoto organico per la crescita di *T. neapolitana*. Inoltre, anche se le produzioni volumetriche con il terreno minimo melasso (MMM medium) sono leggermente inferiori (83.7 mmol  $H_2$ /l) se confrontate con il MCM medium, tali valori ottenuti sono stati ottenuti anche ad una straordinaria semplificazione del terreno.

È interessante notare che le rese di conversione  $H_2$ /S di *T. neapolitana* su melasso sono state superiori rispetto a quanto osservato con siero di latte e in valori calcolati sono vicini alle rese teoriche. In MCM la conversione del substrato in idrogeno, anidride carbonica e acetato effettuata da *T. neapolitana* è del tutto compatibile con il rapporto teorico 4:2:2. *T. neapolitana* cresciuto su MMM ha raggiunto alte rese (2.90 mol  $H_2$ /mol di monosaccaride consumato).

Anche in questo caso, per le ragioni già descritte per, il rapporto  $H_2/CO_2$  non risulta accurato. Il rapporto  $H_2$ /acetate poi è stato calcolato essere leggermente superior all'atteso come è stato osservato con il siero di latte.

La Tabella 3.5 mostra i risultati ottenuti confrontando la cisteina e MBS come agenti riducenti nel MMM medium. In assenza di cisteina la produzione di idrogeno con *T. neapolitana* si è ridotta da 83.7 mmol H<sub>2</sub>/l a 0.7 mmol H<sub>2</sub>/l. L'aggiunta di MBS ha permesso la formazione di idrogeno. La migliore concentrazione testata di MBS è stata quella a 0.25g/L, attestandosi a produzioni di 42.4 mmol H<sub>2</sub>/l e rese H<sub>2</sub>/S comparabili con quelle in presenza di cisteina (2.03 mol H<sub>2</sub>/ mol Glu consumato).

**Tab. 3.5 – Idrogeno, anidride carbonica, acetato e produzione di biomassa con *T. neapolitana* sui terreni con diversi agenti riducenti e diverse concentrazioni.**

	Total mmol H <sub>2</sub>	mmol H <sub>2</sub> / l	Total mmol CO <sub>2</sub>	Total mmol acet.	H <sub>2</sub> /S yield (mmol H <sub>2</sub> /mol S consumed)	CO <sub>2</sub> /S yield (mmol CO <sub>2</sub> /mol S consumed)	X/S yield (g dw/ g S consumed)	H <sub>2</sub> / CO <sub>2</sub> ratio	H <sub>2</sub> / acet. Ratio
<b>MMM</b>	3.349	83.7	1.429	1.950	2.90	1.42	0.126	2.04	1.72
<b>MMM w/o cys</b>	0.029	0.7	0.058	0.084	0.11	0.22	0.119	0.49	0.34
<b>MMM w/o cys + MBS 0,05 gL</b>	1.519	38.0	0.882	1.314	2.26	1.31	0.193	1.73	1.16
<b>MMM w/o cys + MBS 0,10 gL</b>	1.620	40.5	0.874	1.336	1.79	0.97	0.100	1.85	1.21
<b>MMM w/o cys + MBS 0,25 gL</b>	1.697	42.4	0.901	1.040	2.03	1.07	0.097	1.88	1.63
<b>MMM w/o cys + MBS 0,50 gL</b>	0.792	19.8	0.479	0.680	1.00	0.60	0.049	1.65	1.16

Si conclude che l'agente riducente è essenziale anche nel terreno a base di melasso. La concentrazione di cisteina pari a 1g/L è stata mantenuta nel terreno di coltura MMM. La composizione del MMM (esclusa la concentrazione del melasso di 20g/L) è mostrata in tabella 3.6.

**Tab. 3.6 – composizione del MMM**  
**Components g/L**

Hepes	23.8
NaCl	10
NH <sub>4</sub> Cl	0.1
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.7
cysteine	1.0

### 3.8 INIBIZIONE DA IDROGENO

L'inibizione da prodotto è un parametro importante da tenere in considerazione nella produzione di  $H_2$  per via fermentativa. Sebbene si suppone che in colture di *T. neapolitana* sia presente un'inibizione da prodotto, sin'ora nessuno studio ha indicato una concentrazione di  $H_2$  che possa inibire la produzione di ulteriore idrogeno. E' inoltre importante stabilire una concentrazione di  $H_2$  limitante per poter analizzare la cinetica di produzione di idrogeno dai substrati studiati.

L'eventuale inibizione da prodotto è stata prima analizzata in cellule di *T. neapolitana* immobilizzate su Biomax. L'inibizione da prodotto è generalmente indipendente dal mezzo di coltura in esame, quindi si è scelto di analizzare la velocità di produzione volumetrica del batterio cresciuto su un terreno ricco di melasso (20 g/l). L'esperimento è svolto con le modalità descritte nel paragrafo 3.3 della sezione Materiali e Metodi. Le concentrazioni iniziali di  $H_2$  nello spazio di testa dei microcosmi esaminati sono rispettivamente di 1.67 %, 10.12 %, 18.35 %, 28.58 % e 37.24 %. Nelle 4h di durata del test, la concentrazione di  $H_2$  aumenta di poco, quindi questo parametro viene considerato costante. Non essendo ancora stati misurati i valori di biomassa immobilizzata, viene utilizzato come parametro di confronto la velocità di produzione volumetrica di  $H_2$ . Esso è comunque un indice significativo, in quanto tutti i test sono stati effettuati su microcosmi inoculati e cresciuti nelle stesse condizioni nella prima parte della prova: la variabilità dei valori di biomassa adesa dovrebbe quindi risultare relativamente trascurabile. I dati ottenuti alle diverse concentrazioni di idrogeno sono riportati in Figura. 3.21. I valori di produzione volumetrica di  $H_2$  calcolati oscillano da 0.62 a 0.55 mmol $H_2$ /L/h. La figura mostra che non è presente un'evidente inibizione da prodotto per cellule di *T. neapolitana* in presenza di una concentrazione di  $H_2$  pari sino al 37 % dello spazio di testa delle colture batch. La tolleranza all'idrogeno mostrata da cellule immobilizzate di *T. neapolitana* può essere un punto di forza di questo ceppo batterico rispetto ad altri potenziali batteri che producono idrogeno per via fermentativa.

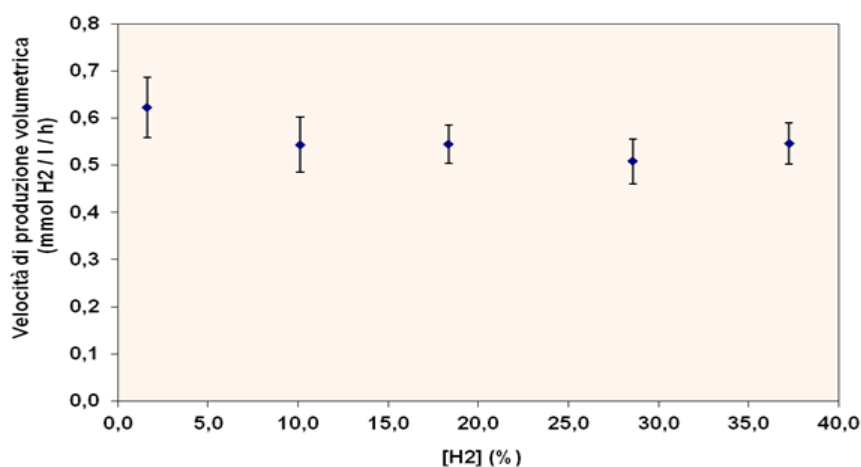


Fig. 3.21 – Velocità di produzione volumetrica di  $H_2$  da cellule di *T. neapolitana* immobilizzate su Biomax a diverse concentrazioni di  $H_2$  iniziali nello spazio di testa.

Lo stesso test è stato effettuato su cellule di *T. neapolitana* cresciute in sospensione, per appurare se le cellule sospese mostrano una minore tolleranza alle alte concentrazioni di  $H_2$  rispetto al biofilm (Fig. 3.21). L'esperimento è stato eseguito con le modalità descritte nel paragrafo 3.4 della sezione Materiali e Metodi. Le concentrazioni iniziali di  $H_2$  nello spazio di testa dei microcosmi esaminati sono rispettivamente di 0.00 %, 5.76 %, 16.00 %, 29.00 % e 45.55 %. Nelle 4h di durata del test, la concentrazione di  $H_2$  aumenta in modo trascurabile, quindi questo parametro viene considerato costante. Come mostrato in figura, i valori di velocità specifica di produzione di  $H_2$  ( $mmolH_2/g_{prot}/h$ ) ottenuti oscillano di poco. La figura mostra che non è presente un'evidente inibizione da prodotto per cellule di *T. neapolitana* cresciute in sospensione in presenza di una concentrazione di  $H_2$  pari sino al 45 % dello spazio di testa delle colture batch. Ulteriori analisi devono essere effettuate per avvalorare i dati ottenuti anche sugli altri substrati, glucosio e siero di latte.

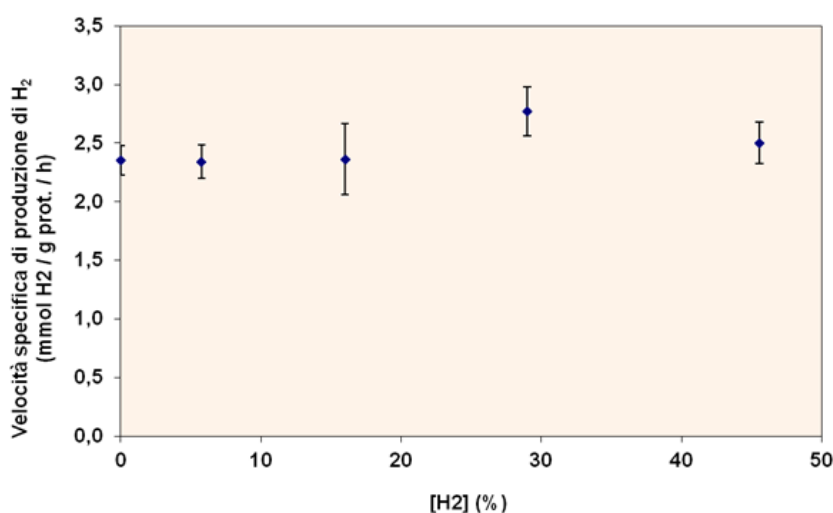


Fig. 3.21 - Velocità specifica di produzione di  $H_2$  da cellule di *T. neapolitana* in sospensione a diverse concentrazioni di  $H_2$  iniziali nello spazio di testa.

### 3.9 INIBIZIONE DA SUBSTRATO

Al fine di ottenere un modello cinetico utilizzabile e per stimare i parametri di affinità al substrato ( $K_s$ ), la costante di inibizione per ogni substrato ( $K_i$ ) e le velocità specifiche massime di produzione di idrogeno ( $q_{max}$ ) abbiamo studiato e analizzato le cinetiche di produzione idrogeno di *T. neapolitana*.

Il modello cinetico utilizzato è stato quello di Haldane/ Andrews che racchiude in esso un fattore di inibizione.

$$q_{H_2} = \frac{q_{\max, H_2} \cdot S}{K_S + S + S^2 / K_I}$$

Il modello Haldane / Andrew è il modello più comunemente utilizzato per descrivere la crescita batterica considerando un fattore di inibizione. Questo modello è stato considerato appropriato per il nostro caso.

## GLUCOSIO

Diverse concentrazioni di glucosio sono state testate sul terreno modATCC1977 al fine di studiare le velocità di produzione da *T. neapolitana* sia a biomassa sospesa che a biomassa adesa.

La velocità specifica di produzione H<sub>2</sub> è stata confrontata a diverse concentrazioni di substrato. (Figura 3.22). Nella figura 3.23 (biomassa sospesa) e 3.24 (biomassa adesa) viene riportato un ingrandimento della figura 1.25. . I dati sono stati elaborati utilizzando il metodo del best fit non lineare mediante l'utilizzo dei minimi quadrati in excel. I valori migliori dei diversi parametri cinetici sono mostrati in Tabella 3.7.

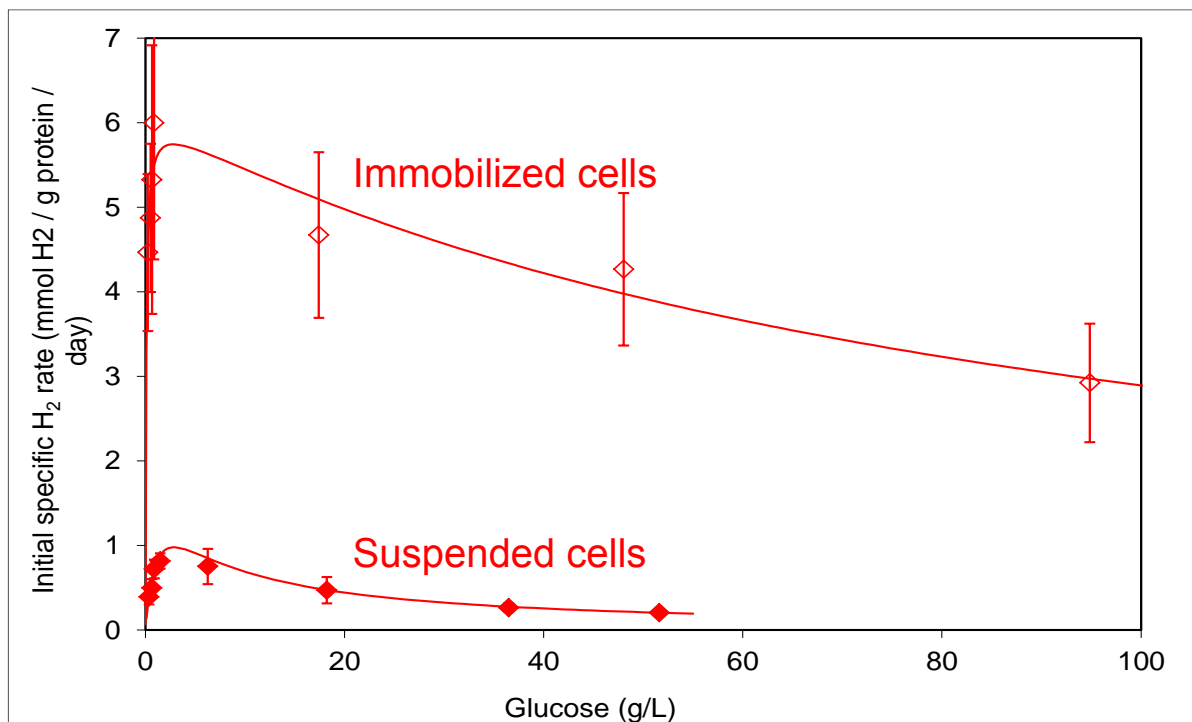


Figure 3.22 – Specific hydrogen production rate versus initial glucose concentration by *T. neapolitana* on ATCC 1977 media.

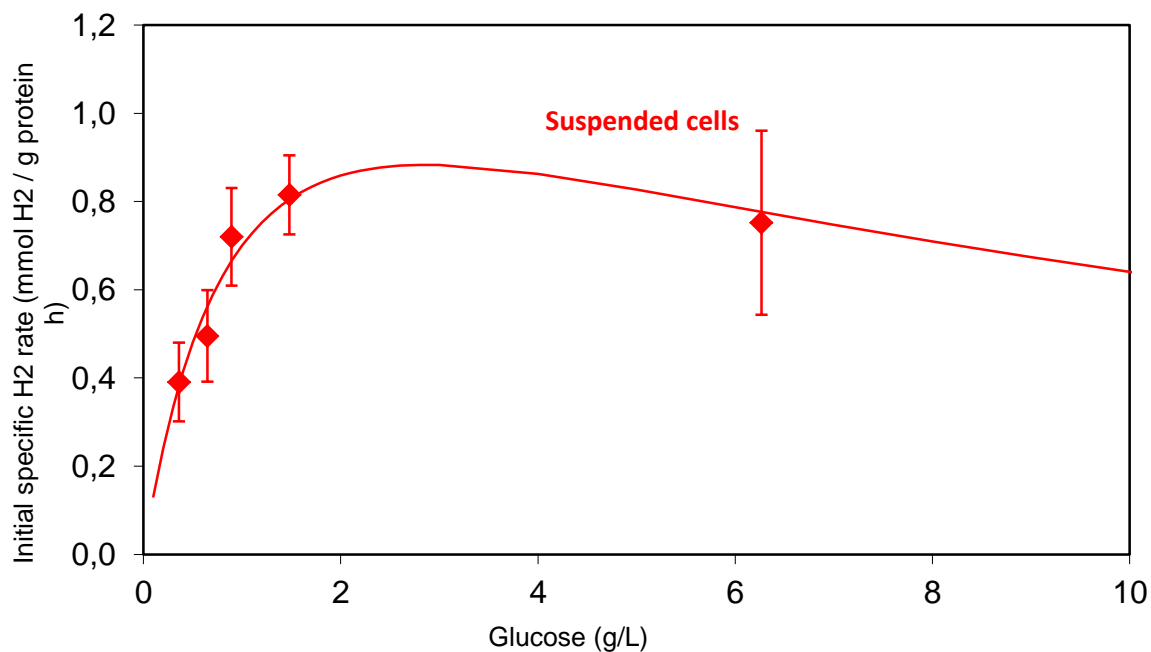


Figure 3.23 – Specific hydrogen production rate versus initial glucose concentration (0-6 g/l) by *T. neapolitana* on ATCC 1977 media. Zoom of Figure 4.25 for suspended cells.

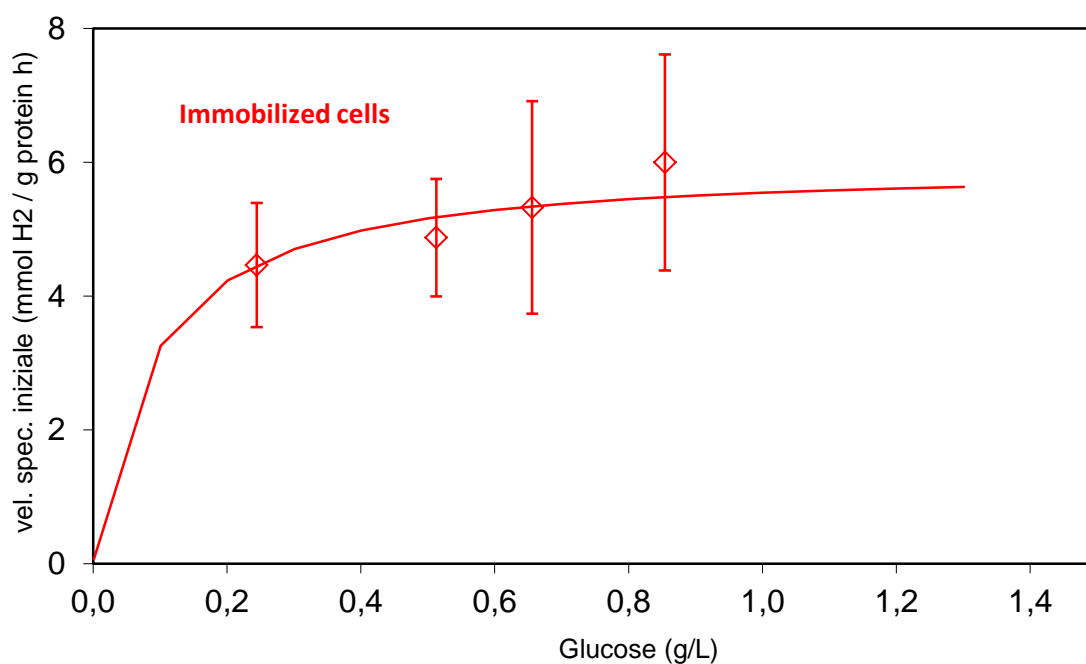


Figure 3.24 – Specific hydrogen production rate versus initial glucose concentration (0-1 g/l) by *T. neapolitana* on ATCC 1977 media. Zoom of Figure 4.25 for immobilized cells.

Possiamo notare come il fenomeno di inibizione da substrato si sia manifestato in maniera inferiore nel test a biomassa adesa rispetto a quanto notato durante il test a biomassa sospesa.

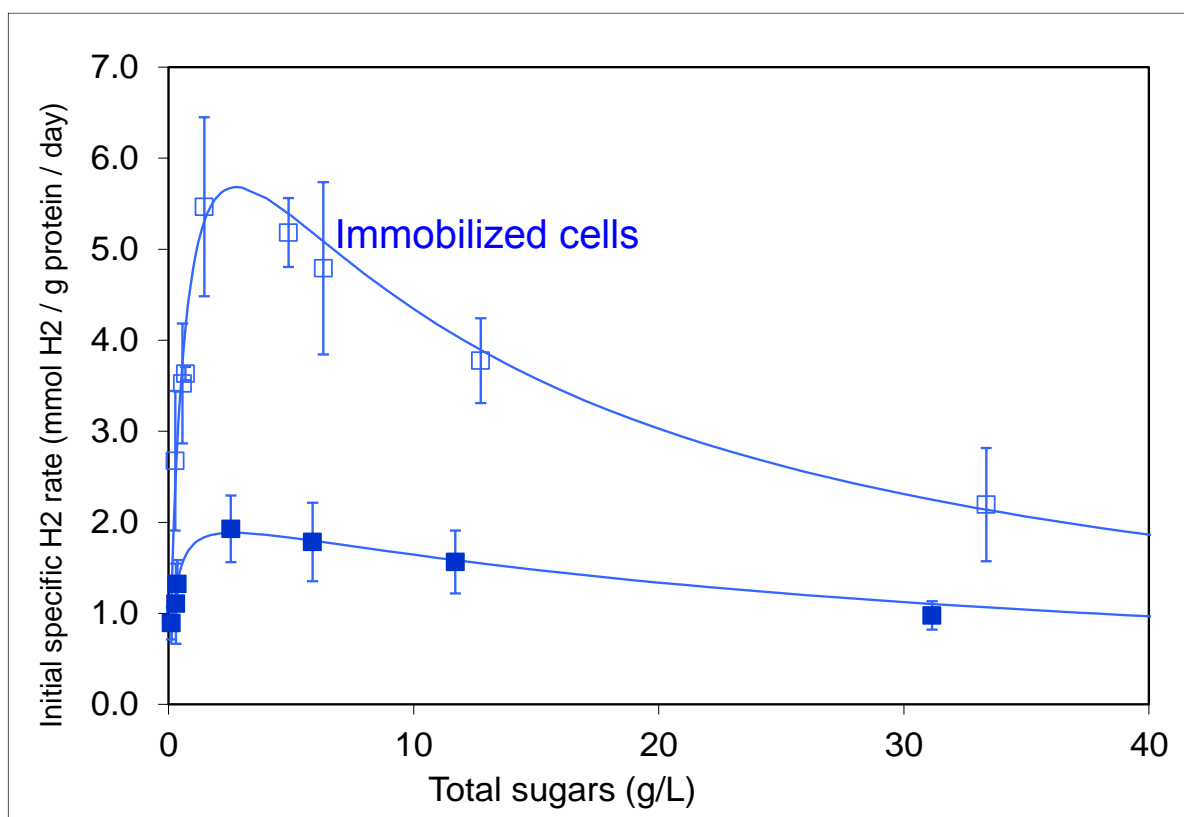


**Tabella 3.7 – costanti cinetiche con glucosio**

	Cells conditions	$q_{\max \text{ H}_2}$	$K_s$	$K_i$
		(mmol $\text{H}_2$ / g <sub>protein</sub> / h)	(g / L)	(g / L)
Glucose	Immobilized	6.10	0.09	90.2
	Suspended	1.86	1.30	6.4

## MELASSO

Diverse concentrazioni di terreno minimo a base di melasso sono state testate al fine di valutare le velocità iniziali specifiche di produzione idrogeno con *T. neapolitana* sia in test a biomassa sospesa che in test a biomassa adesa. Le velocità specifiche iniziali sono mostrate in figura 3.25 in relazione alle varie concentrazioni iniziali di melasso. La figura 3.26 (biomassa sospesa) e 3.27 (biomassa adesa) sono ingrandimenti della figura 3.25. I parametri cinetici sono mostrati in tabella 3.8.



**Figure 3.25 – Specific hydrogen production rate versus initial molasses concentration by *T. neapolitana* on Minimal medium for molasses.**

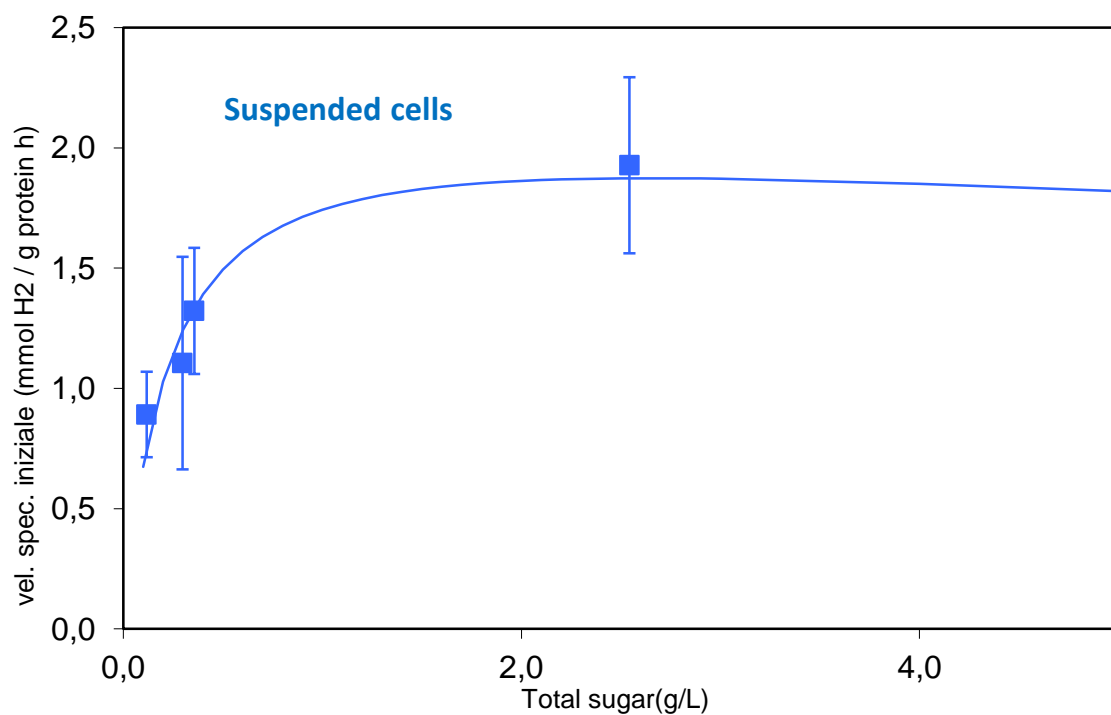


Figure 3.26 – Specific hydrogen production rate versus initial molasses concentration (0-2.5 g/l) by *T. neapolitana* on minimal medium for molasses. Zoom of Figure 4.28 for Suspended cells.

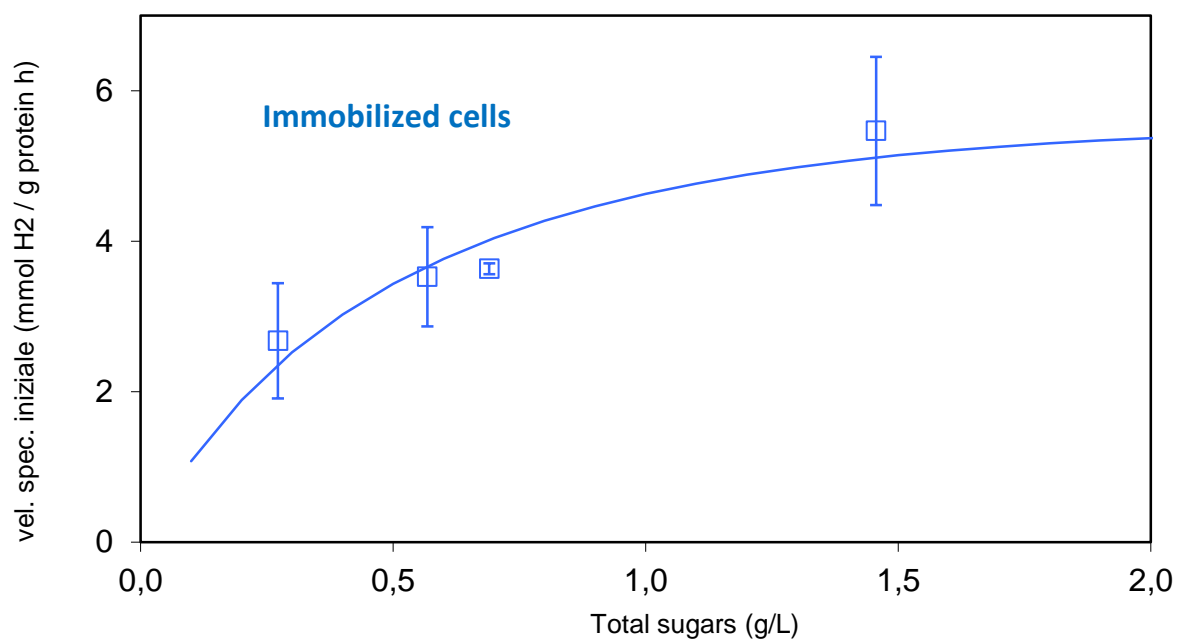


Figure 3.27 – Specific hydrogen production rate versus initial molasses concentration (0-1.5 g/l) by *T. neapolitana* on minimal medium for molasses. Zoom of Figure 4.28 for immobilized cells.

Anche nel caso del melasso si nota un ridotto fenomeno di inibizione nel caso in cui si consideri un processo a biomassa adesa.

**Tabella 3.8 – parametri cinetici con melasso.**

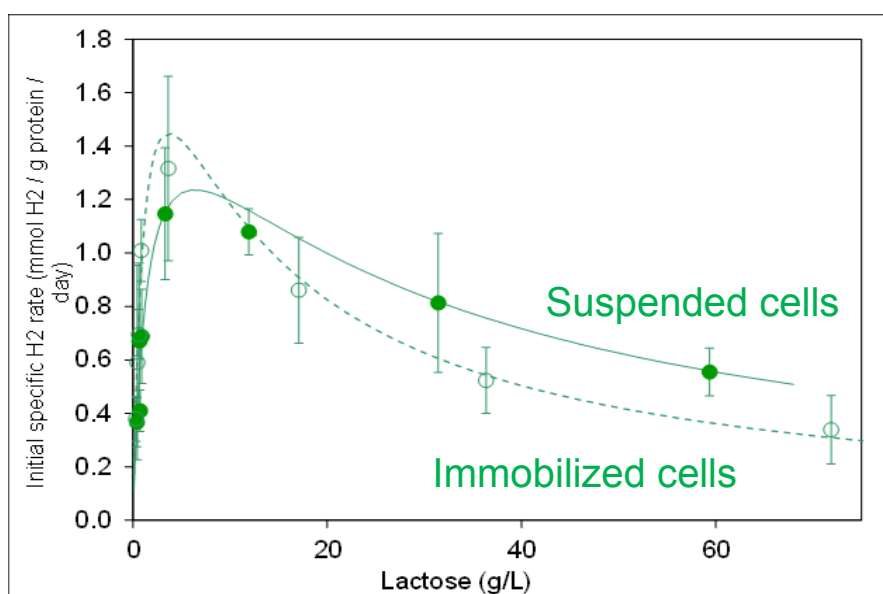
	Cells conditions	$q_{\max \text{ H}_2}$	$K_s$	$K_i$
		(mmol $\text{H}_2$ / g <sub>protein</sub> / h)	(g / L)	(g / L)
Molasses	Immobilized	8.47	0.68	11.4
	Suspended	2.21	0.23	31.4

I valori  $K_i$  ottenuti su biomassa adesa sono superiori rispetto a quanto osservato a biomassa sospesa.

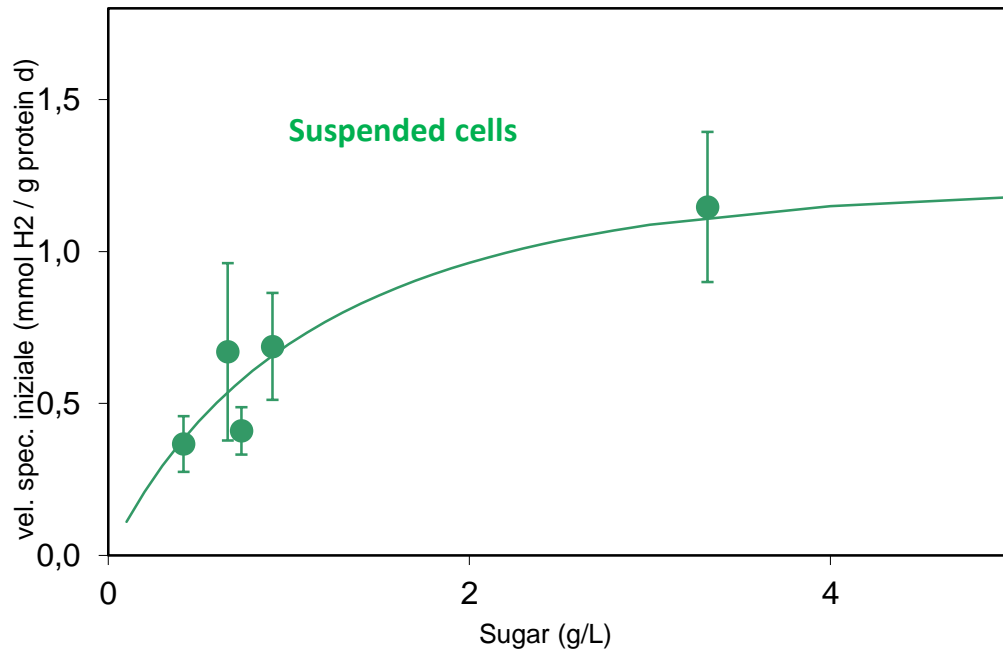
## SIERO DI LATTE

Diverse concentrazioni di siero di latte sono state testate al fine di valutare il fenomeno di inibizione da substrato su *T. neapolitana* con questa matrice. I test sono stati condotti sia a biomassa sospesa che a biomassa adesa.

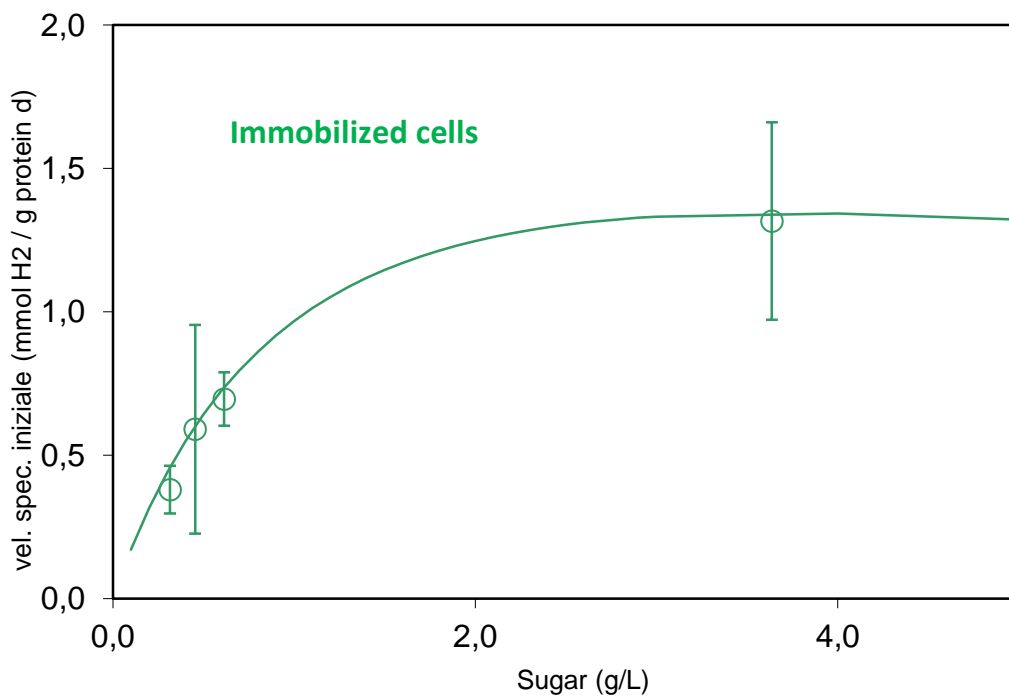
Le velocità iniziali di produzione idrogeno sono confrontate a diverse concentrazioni di substrato e sono osservabili in figura 3.28. Nelle figure 3.29 (biomassa sospesa) e 3.30 (biomassa adesa) sono presenti ingrandimenti della figura 3.28. I parametri cinetici sono mostrati in tabella 3.9.



**Figure 3.28 – Specific hydrogen production rate versus initial milk whey concentration by *T. neapolitana* on Minimal medium for milk whey.**



**Figure 3.29 – Specific hydrogen production rate versus initial milk whey concentration (0-3.5 g/l) by *T. neapolitana* on minimal medium for milk whey. Zoom of Figure 4.28 for Suspended cells.**



**Figure 3.30 – Specific hydrogen production rate versus initial milk whey concentration (0-3.8 g/l) by *T. neapolitana* on minimal medium for milk whey. Zoom of Figure 4.28 for immobilized cells.**

Per siero di latte si può vedere una leggera differenza tra biomassa sospesa e immobilizzata, con biomassa immobilizzata vi è una maggiore  $q_{max}$  rispetto a quanto osservabile con biomassa sospesa, una significativa differenza, piccola ma sufficiente a garantire che le

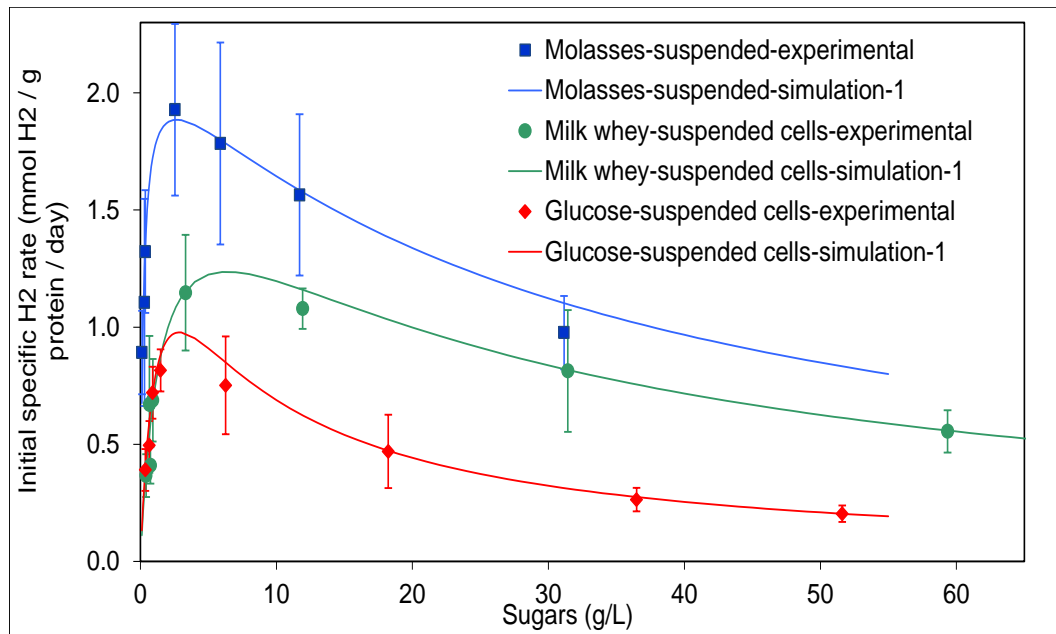
condizioni di biofilm nella produzione di H<sub>2</sub> sono migliori di quelli con sospensione biomassa. Per siero di latte l'inibizione del substrato è molto più evidente rispetto a quanto osservato con le altre fonti di carbonio.

**Tabella 3.9 – parametri cinetici con siero di latte.**

	Cells conditions	$q_{\max \text{ H}_2}$	$K_s$	$K_i$
		(mmol H <sub>2</sub> / g <sub>protein</sub> / h)	(g / L)	(g / L)
<b>Molasses</b>	<b>Immobilized</b>	<b>2.51</b>	<b>1.36</b>	<b>10.1</b>
	<b>Suspended</b>	<b>1.84</b>	<b>1.54</b>	<b>26.3</b>

Da valori più alti di 10.1 g/L con siero di latte *T. neapolitana* soffre di inibizione. A valori inferiori di 10.1 g/L si è avuta una miglior produzione operando in condizioni di biomassa adesa, questo è molto importante per impostare il processo di scale up.

Utilizzando i dati ottenuti dalle prove sopra presentate con biomassa sospesa è stato sviluppato il modello Lumped (figura 3.31):



**Figure 3.31 - Comparison among the three substrates with suspended biomass**

L'inibizione da substrato è stata quindi osservata con l'impiego di ognuno dei 3 substrati. Come mostrato in tabella i risultati migliori sono stati ottenuti impiegando il melasso in quanto è evidente una grande affinità da parte di *T. neapolitana* per questo substrato (dato mostrato dai bassi valori di  $K_s$ ) e di contro il manifestarsi dell'inibizione da substrato risulta evidente solo ad

altissimi valori di  $K_i$ . Tuttavia, anche per glucosio e siero di latte l'inibizione da substrato risulta essere significativa soltanto a valori di concentrazioni di zuccheri in g/L molto superiori delle concentrazioni operative di reattori industriali tipo CSTR, ciò definisce che la scelta del substrato verte su altri parametri che esulano dalla presente prova e che sono essenzialmente la sua reperibilità nel territorio e il suo prezzo unitario. Per questa serie di motivi risulta molto più interessante svolgere lo scale-up del processo impiegando il siero di latte (più economico e facilmente reperibile) anziché il melasso.

Un altro importante aspetto riscontrato a seguito degli esperimenti svolti è il significativo vantaggio della biomassa adesa rispetto a quella sospesa utilizzando il glucosio o il melasso, ma non con siero di latte dove si evidenzia una maggiore affinità rispetto a quanto osservato con biomassa sospesa ma di contro un fenomeno di inibizione da substrato che inizia a più basse concentrazioni. Ad ogni modo questo non modifica la scelta di impegnare il siero di latte come fonte di carbonio nel processo di scale-up.

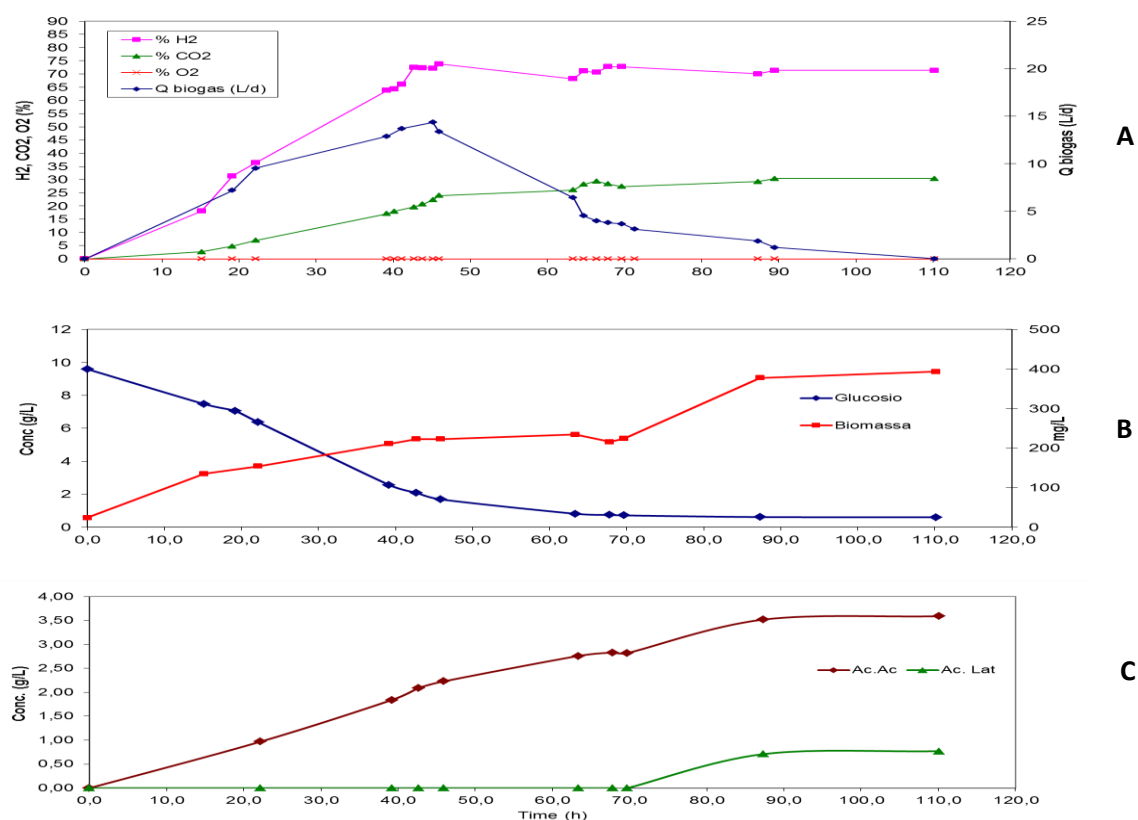
### 3.10 PROVE DI SCALE-UP SU REATTORE SPCSTR 19L

Il siero di latte è stato scelto come substrato per la conduzione delle prove con reattore da 19L. Questa scelta è stata dettata dal fatto che sul territorio regionale (Emilia Romagna) esso rappresenta la biomassa con una gestione più problematica rispetto al melasso. I test condotti in reattore hanno la finalità di confrontare parametri di resa e produttività del processo in uno scale up in cui il volume del reattore SPCSTR è c.ca 158 volte superiore rispetto al volume delle vial dove in cui sono state condotte le prove batch.

La serie di prove svolte in reattore sono essenzialmente:

- Test batch volto a valutare l'influenza del volume di inoculo utilizzando il glucosio come fonte di carbonio;
- Test batch con siero di latte sia a biomassa sospesa che a biomassa adesa;
- Test in continuo a biomassa adesa su siero di latte (dati non raccolti dal sottoscritto).

Qui di seguito, a titolo illustrativo, mostriamo una serie di grafici (Figura 3.32) dei parametri monitorati durante le prove in reattore. I grafici si rifanno ad una prova batch eseguita su glucosio e inoculo al 5% vol.



**Figura 3.32 – parametri controllati sul reattore. A) volume e composizione del biogas con analisi H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>; B) Biomassa e zuccheri C) Acidi organici.**

## SCELTA DEL VOLUME D'INOCULO

Questo primo test svolto con reattore da 19L è stato condotto inoculando *T. neapolitana* a diverse concentrazioni iniziali su terreno completo contenente glucosio come fonte di carbonio. La scelta di svolgere questo tipo di test su glucosio dipende dal fatto che è una matrice pura grazie alla quale è più semplice valutare il comportamento della fermentazione. Il fine del test è valutare se un inoculo all'1% in volume è affidabile per la successiva conduzione della prova, esso infatti è stato confrontato al tradizionale inoculo, pari al 5% in volume utilizzato in tutti i test su vial da 116mL.

La figura 3.33 mostra i più importanti parametri di fermentazione confrontando 2 prove batch svolte in reattore da 19L a diversa concentrazione iniziale d'inoculo (5% e 1%) ed una prova in vial da 116mL (inoculo al 5%).

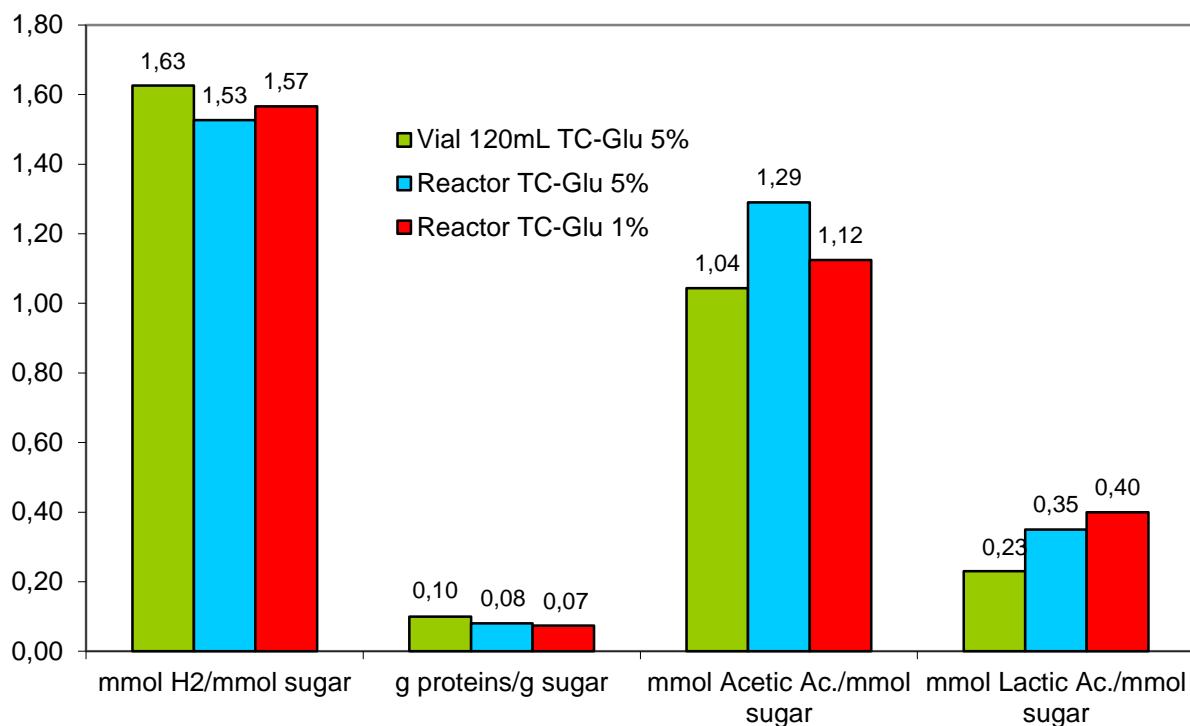


Figure 3.33 – confronto dei parametri da vial da 116mL a reattore da 19L con diverso volume di inoculo

Possiamo notare che la modifica del volume iniziale di inoculo non incide sostanzialmente il valore dei parametri considerati e che non sono apprezzabili variazioni nel passaggio dalla vial 116mL al reattore da 19L. In questa situazione quindi possiamo concludere che un inoculo di *T. neapolitana* all' 1% è certamente la condizione operativa migliore per lo start del reattore in quanto permette un notevole risparmio di tempi e volumi operativi e rende l'operazione di inoculo del reattore (fase critica) molto più veloce.



## BATCH TEST CON SIERO DI LATTE

Per le motivazioni indicate il siero di latte è stato scelto come substrato e fonte di carbonio con la quale condurre le prove di produzione idrogeno su reattore da 19L. A tal fine sono state affrontate esperienze sia a biomassa sospesa sia a biomassa adesa, mediante l'impiego del supporto Biomax selezionato durante le prove in vial da 116mL. Il medium utilizzato per le prove qui descritte è stato il terreno minimo.

### *Biomassa Sospesa*

Qui di seguito riportiamo il grafico dei parametri per la prova a biomassa sospesa, vol. inoculo 1%, terreno minimo con siero di latte (Figura 3.34).

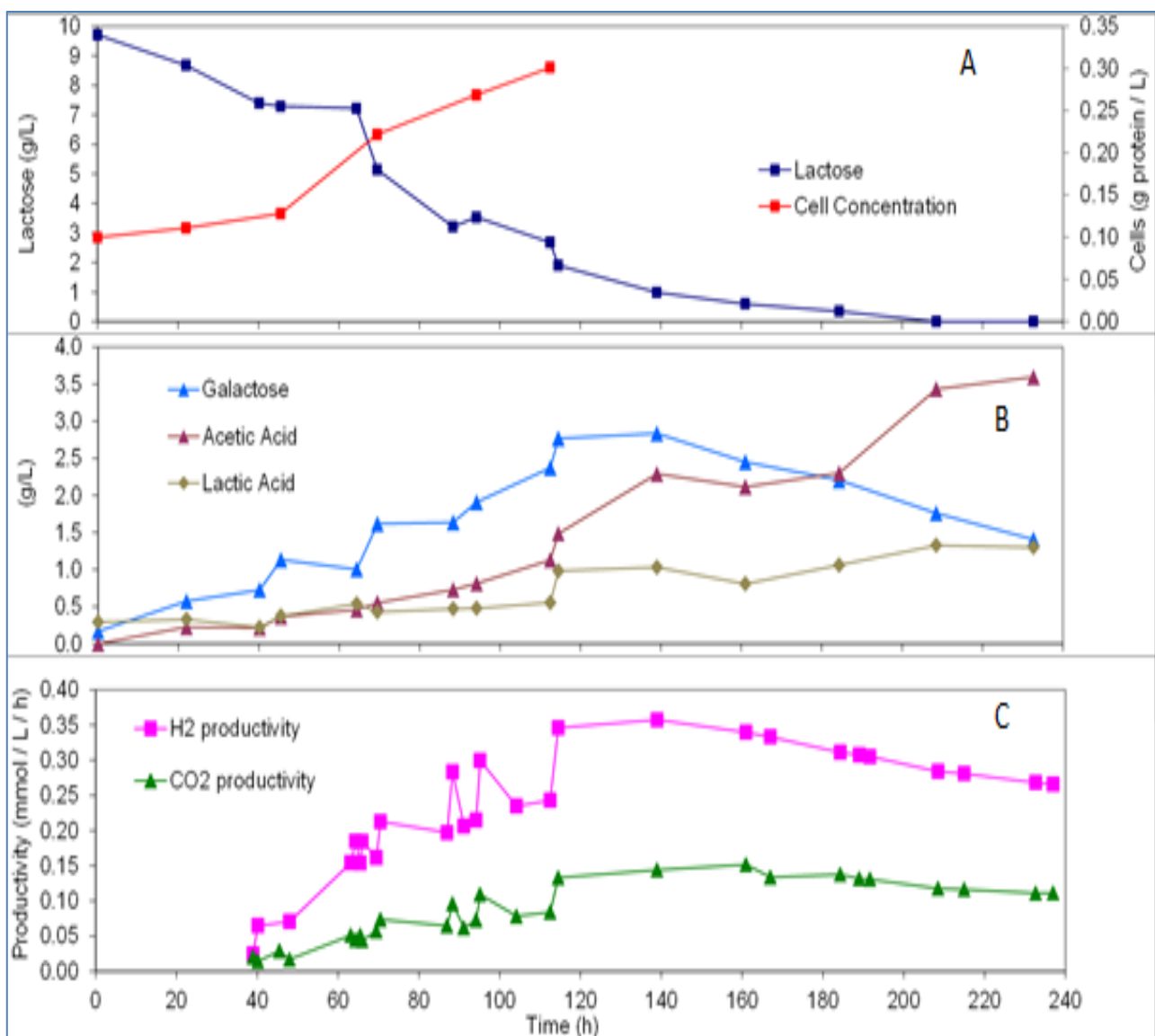
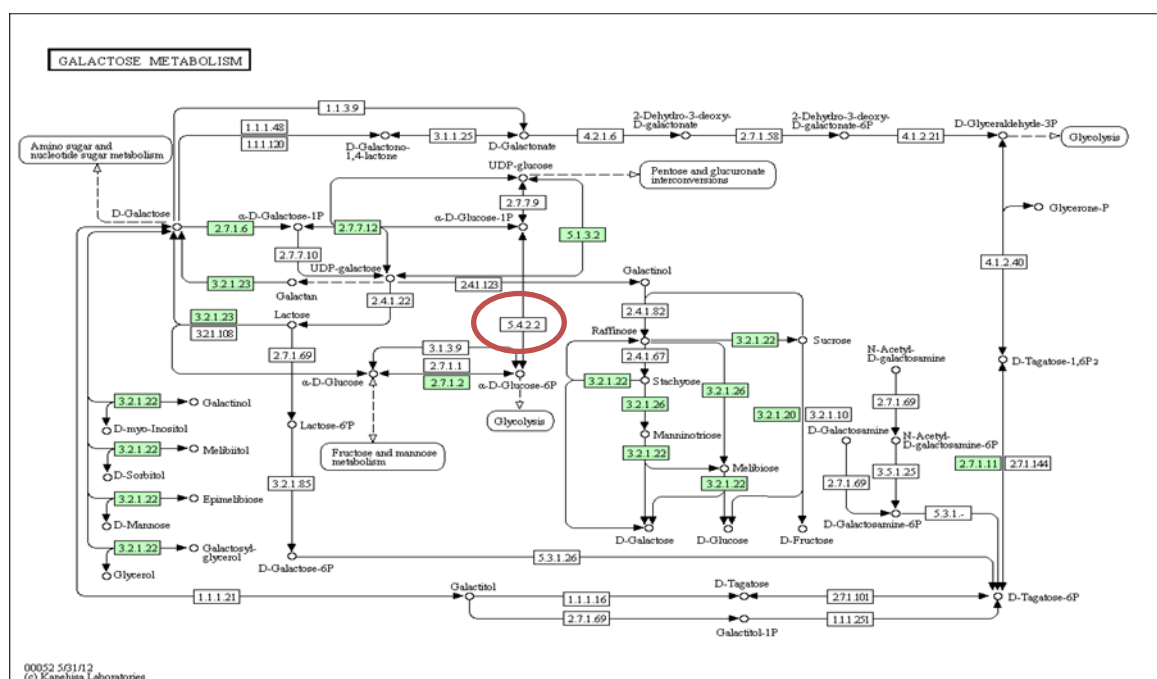


Figure 3.34 – Profilo del consumo di substrati e accumulo di prodotti liquidi e gassosi nel test a biomassa sospesa con siero di latte come fonte principale di carbonio.

I risultati sulle produzioni di idrogeno e anidride carbonica sono stati inferiori rispetto a quanto osservato nella prova su glucosio con inoculo all'1%. L'andamento dei rimanenti parametri invece resta coerente con quanto osservato nelle prove il cui medium era a base di glucosio.

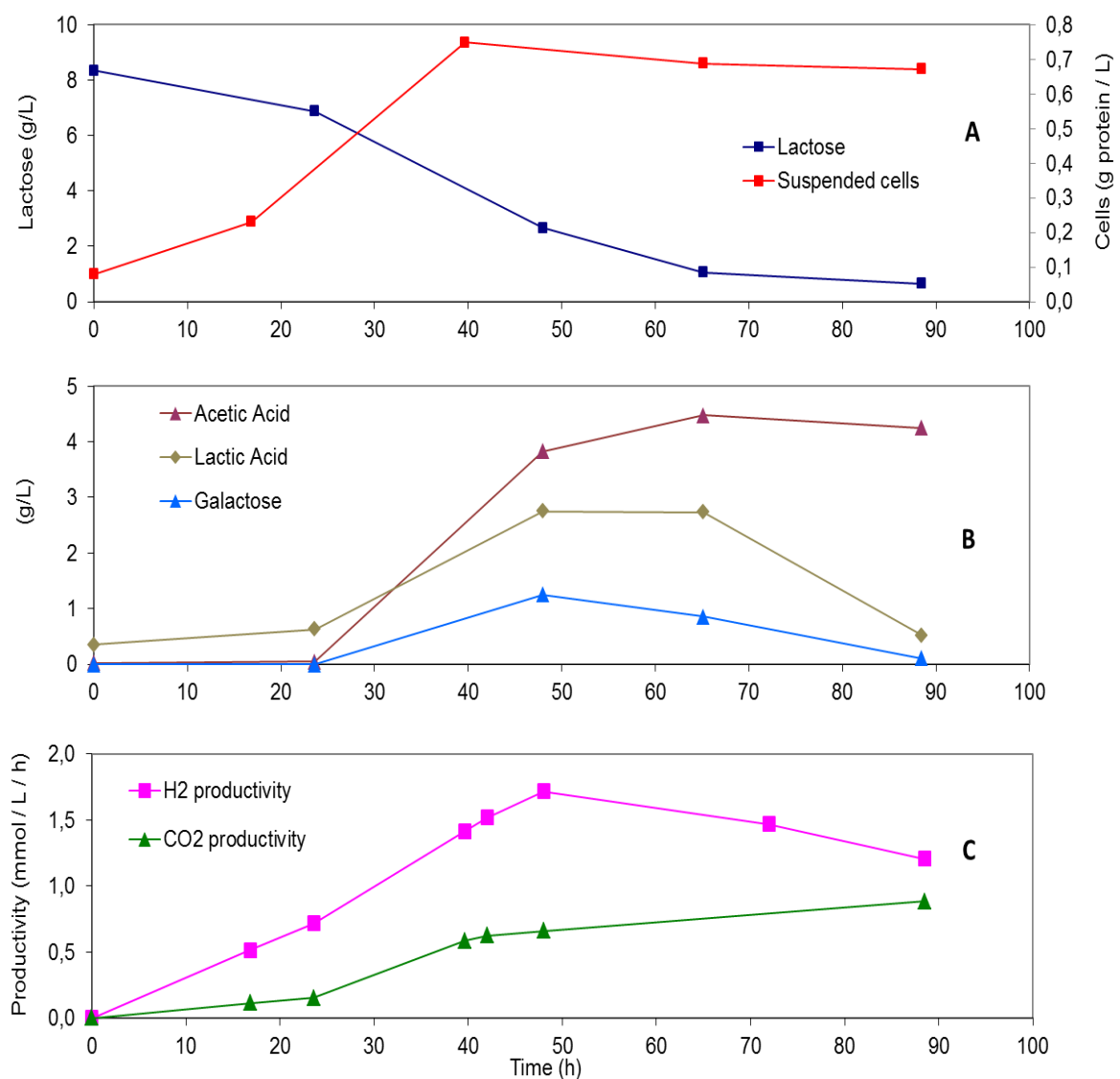
Un aspetto scientificamente importante evidenziato dalla prova svolta con siero di latte è che essa descrive un particolare comportamento di *T. neapolitana*. Fenomeni di crescita diauxica sono stati già descritti [65] (Vargas M, Noll KM., 1996) ma in medium contenenti in contemporanea glucosio (Glu) e lattosio (Lat). Nel nostro caso *T. neapolitana*, posto in condizione di utilizzare il solo lattosio, anziché consumare parimenti i due monomeri ottenuti dall'azione della  $\beta$ -galattosidasi (Tu N. Nguyen et al., 2006) privilegia il consumo del Glu anziché del galattosio (Gal) che si accumula nel medium fino a c.ca t=120h (Fig. 4.39). Questa preferenza è stata osservata fino ad una certa concentrazione di lattosio, quando la concentrazione di lattosio è circa 2 g/L, il galattosio comincia ad essere consumato, probabilmente perché oltre questa soglia di concentrazione l'inibizione da catabolita viene meno. Per quanto riguarda la via metabolica che converte il galattosio a H<sub>2</sub> in *T. neapolitana*, il diagramma biochimico (figura 3.35) presente nella banca dati KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) evidenzia l'assenza del gene che codifica per l'enzima fosfoglucomutasi (EC n° 5.4.2.2). Tale enzima catalizzerebbe la seguente reazione che converte il glucosio  $\alpha$ -D-glucosio 1-fosfato prodotto da galattosio in D-glucosio 6-fosfato che a sua volta può potremmo così entrare in glicolisi.



Gli esperimenti di produzione di  $H_2$  da lattosio comunque indicano produzione di biogas da Gal il cui catabolismo quindi segue probabilmente vie alternative a quella mostrata in KEGG per entrare in glicolisi e poter essere convertito a  $H_2$  e acidi organici. Il fenomeno è stato osservato in tutte le prove solte in reattore (SP)CSTR. La capacità di crescita su Glu era stata comunque già osservata (HW Jannasch *et al.*, 1988).

### Biomassa Adesa

Il passaggio successivo alla prova con biomassa sospesa su medium a base di siero di latte è stata quella di svolgere test a biomassa adesa. La prova è stata condotta come descritto nel capitolo materiali e metodi utilizzando sacchetti di rete in inox contenuti Biomax. La Figura 3.36 mostra l'andamento dei parametri durante il test.



**Figura 3.36 - Profilo del consumo di substrati e accumulo di prodotti liquidi e gassosi nel test a biomassa adesa con siero di latte come fonte principale di carbonio.**

Va specificato che la prova qui mostrata è stata svolta dopo un precedente arricchimento di biomassa adesa ai supporti. Questo è stato ottenuto mediante la conduzione di una prova su terreno minimo siero di latte inoculo 1%. A seguito di questa prova, il medium esausto è stato allontanato e sostituito con terreno fresco, pompato all'interno del reattore in contemporanea ad un flussaggio di azoto in modo da ridurre al minimo il contatto delle cellule di *T. neapolitana* con l'ossigeno. Una volta riempito il reattore la temperatura è stata fatta salire fino al raggiungimento dei 77°C e il flussaggio di azoto è stato spento (questo è stato il momento zero in cui sono stati fatti campionamenti di liquido e gas).

La biomassa analizzata durante la prova a biomassa adesa è quella sospesa, non è infatti possibile campionare supporti durante la prova. Il campionamento è possibile esclusivamente al momento zero e al momento finale della prova, una volta aperto il reattore.

Constatiamo che in questa prova la fermentazione viene portata a termine molto velocemente. Dopo 90h infatti non ci sono più zuccheri disponibili e la fermentazione si blocca. Questo è certamente dovuto alla grande quantità di biomassa presente nel reattore e adesa ai supporti.

La produttività di idrogeno più alta è stata osservata a 50h dopo lo start della prova che si è attestata ad un 1.75 mmol H<sub>2</sub>/Lmedium/h, 5 volte maggiore rispetto a quanto osservato a biomassa sospesa su siero di latte. In questa prova il galattosio è stato completamente consumato. Probabilmente questo è dovuto alla presenza di una quota di biomassa batterica già acclimatata alla degradazione di tale substrato.

Il test a biomassa adesa ha restituito quindi dati confortanti, la fermentazione è avvenuta senza particolari problemi. La produzione di idrogeno è stata sensibilmente superiore rispetto a quanto osservato nel test a biomassa sospesa e le velocità di conversione maggiori. Quest'ultima considerazione è rilevante in quanto un aumento delle velocità di conversione determinano una riduzione del costo di produzione dell'idrogeno.

## TEST DI PRODUZIONE IN CONTINUO DI IDROGENO A BIOMASSA ADESA

Il test condotto in continuo con biomassa adesa su siero di latte è stato condotto al fine di individuare il valore di ritenzione idraulica ottimale in base alla produttività di idrogeno. A tal fine sono stati testati diversi tempi di ritenzione e fattori di diluizione (Tabella 3.10).

$$D_P = \frac{F \cdot P}{V} = D \cdot P(D)$$

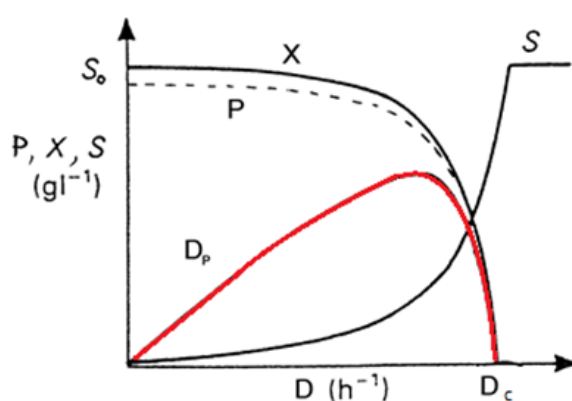


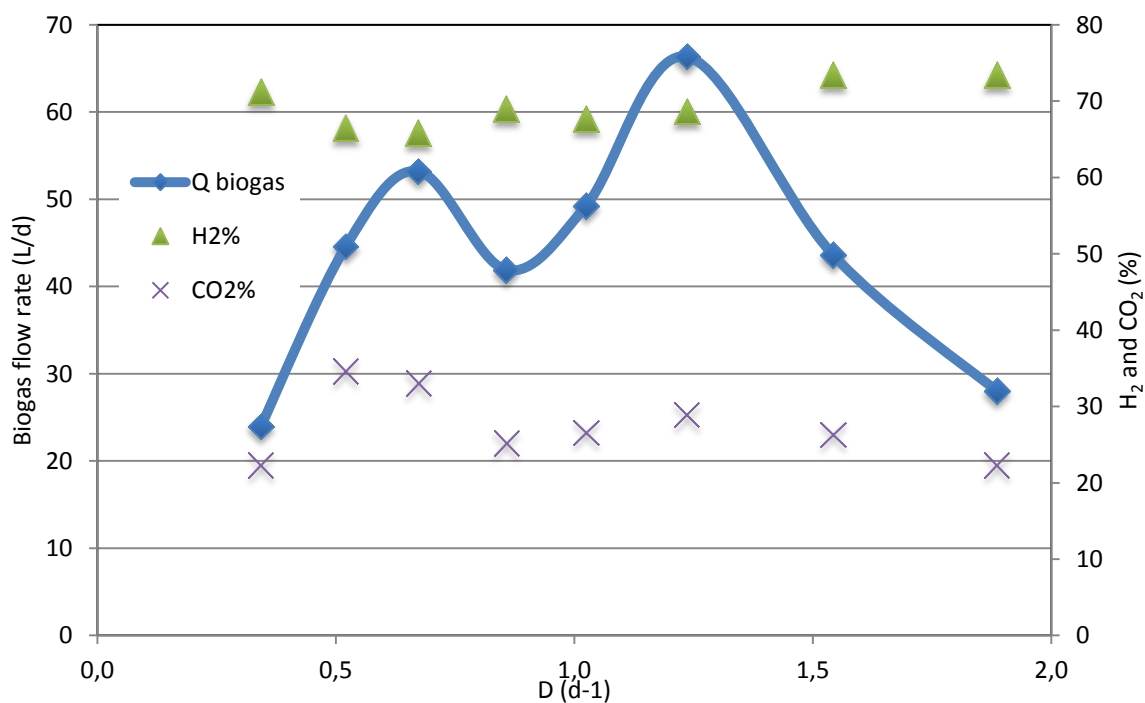
Figura 3.37:- comportamenti in concentrazione di (P) prodotto, (X) Biomassa (S) Substrato all'aumentare di (D) fattore di diluizione..

Il valore di  $D_P$  (la produttività) dipenderà dal fattore di diluizione ( $D$ ) e dalla velocità di formazione del prodotto. Il variare di  $D_P$  al variare di  $D$  è del tutto simile a quanto si osserva a proposito della biomassa ( $X$ ) all'interno di un chemostato. All'aumentare della velocità di diluizione ( $D$ ) infatti la concentrazione del prodotto ( $P$ ) all'interno del reattore resta costante fino ad un valore critico di  $D$  oltre al quale si manifesta una sua diminuzione dovuta a diluizione. La produttività ( $D_P$ ) aumenta all'aumentare del valore di  $D$  sino ad un punto critico oltre al quale essa diminuisce, fino ad azzerarsi. Seguendo questo andamento risulta chiaro che il valore di  $D$  (velocità di diluizione) ottimale verrà individuato in corrispondenza del valore in cui si avrà la massima produttività di idrogeno. Il nostro processo e il reattore impiegato determineranno una piccola variazione sul profilo della produttività del nostro  $P$ , questo sarà dovuto al fatto che  $P$  è un gas e che quindi non sarà completamente solubilizzato nel medium. Altro fattore che affliggerà la rielaborazione sarà presenza di biomassa adesa e non sospesa.

**Tabella 3.10** – impostazione del test in continuo

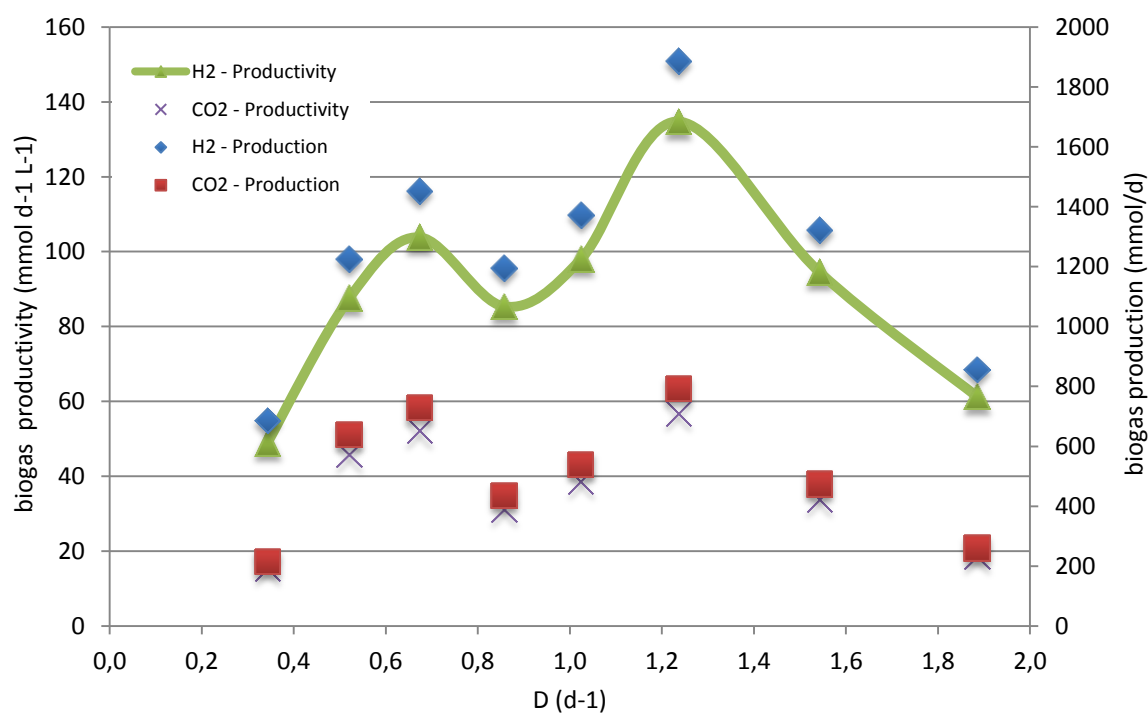
Flow (L/h)	Time retention (h)	D (d <sup>-1</sup> )
0.20	70	0.343
0.30	48	0.510
0.40	35	0.673
0.50	28	0.857
0.60	24	1.024
0.72	20	1.236
0.90	15	1.543
1.10	13	1.886

In Figura 3.38 viene mostrato il profilo di produzione biogas al variare del parametri D. La produzione massima si è raggiunta ad un valore 1.24 d<sup>-1</sup> con una produzione di 66L/giorno. La composizione del biogas invece è costante al variare del valore di D.



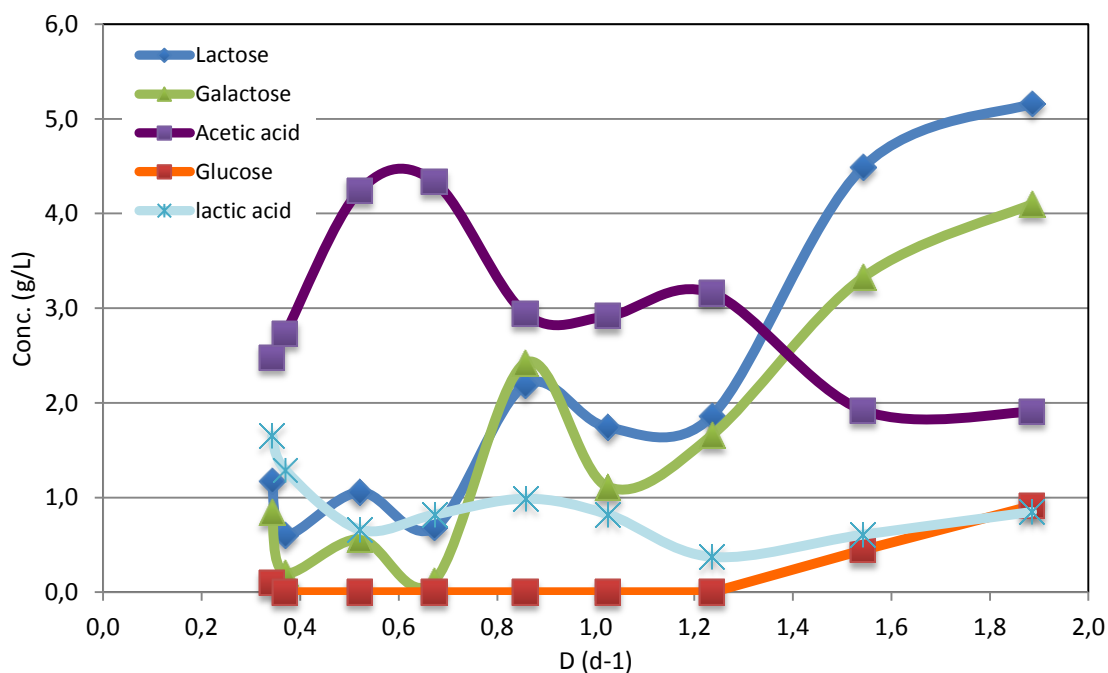
**Figura 3.38-** Portata di biogas (Q), concentrazioni di H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> al variare di D nel SPCSTR.

La figura 3.39 mostra l'andamento dei parametri di produttività e produzione di  $H_2$  e  $CO_2$ .



**Figura 3.39 – Profili delle produttività e produzioni di  $H_2$  e  $CO_2$  al variare di D.**

La curva delle rese a diversi D è perfettamente coerente con la curva delle produzioni volumetriche di biogas della figura 4.41 e la produttività di idrogeno è massima a  $D = 1.24 d^{-1}$ ,  $135 mmol H_2/L/giorno$ . In Figure 3.40 vengono mostrati i profili degli zuccheri e dei prodotti di fermentazione ai diversi D testati.



**Figura 3.40 – Profili delle concentrazioni di substrati e prodotti di fermentazione al variare di D.**

Aumentando il fattore di diluizione abbiamo osservato un aumento della concentrazione degli zuccheri nell'effluente del reattore. Questo mostra come la capacità di conversione dell'intero sistema scenda all'aumentare del valore di D testato. La tabella 3.11 riassume alcuni parametri dei test svolti con prove in continuo. Vengono qui elencati e confrontati i valori di portata di biogas espresso in L/giorno e il fattore di conversione degli zuccheri. Il migliore valore di D testato è  $1.236 \text{ d}^{-1}$ .

**Tabella 3.11-** riassunto dei parametri per i test in continuo.

Flow (L/h)	T (h)	D ( $\text{d}^{-1}$ )	Q biogas (L/d)	H <sub>2</sub> %	CO <sub>2</sub> %	Sugar conversion %
0.22	70	0.37	24	71	22	79
0.3	47	0.51	44.6	66	34.7	87
0.4	35.7	0.67	53.2	65	33	93
0.5	28	0.857	42	69	25.2	61
0.6	23.4	1.024	49.2	68	26.6	72
0.72	19.4	1.236	66.3	68.7	28.9	65
0.9	15.6	1.543	43.6	73	26.3	39
1.1	12.5	1.886	28	73	22.3	33



## CONSIDERAZIONI FINALI

Durante il presente dottorato sono stati raggiunti numerosi obiettivi presenti all'interno del progetto Bio-Hydro.

Sostanzialmente in questo lavoro è stato selezionato il ceppo migliore di *Thermotoga* fra quattro ceppi testati: *T. neapolitana*. È stato studiato il valore di pH ottimale per la produzione di idrogeno per via fermentativa: 8.5 a temperatura ambiente; un intenso lavoro sul terreno di coltura ne ha permesso la minimizzazione al fine di renderlo economicamente sostenibile per un suo utilizzo nel il processo in continuo nel reattore da 19L: sono stati così eliminati micronutrienti e le vitamine, i componenti più costosi.

Gli studi in vial da 116mL hanno portato ad una buona conoscenza del metabolismo di *T. neapolitana* in merito ai fenomeni di inibizione da substrato utilizzando tutti i substrati testati glucosio, melasso e siero di latte, a seguito di ciò sono state individuate le concentrazioni operative migliori per la conduzione del processo. È stata investigata l'inibizione da prodotto e quindi da Idrogeno sul metabolismo di *T. neapolitana* ed è stato concluso che il metabolismo di *T. neapolitana* non ne è inibito.

È stato selezionato il miglior supporto su cui far crescere la biomassa per sviluppare un processo di produzione di idrogeno che si basasse sulla capacità di *T. neapolitana* di sviluppare un biofilm capace di aderire alle superfici.

Tutte le prove preliminare in vial hanno restituito dati utilizzabili per il processo di scale up nel reattore SPCSTR.

L'innovativo reattore SPCSTR è stato interamente studiato, progettato e costruito presso il DICMA. dell'Università di Bologna. Questo ha determinato uno sviluppo sostanziale del know-how necessario alla realizzazione di reattori con volumetrie di media scala necessari per lo svolgimento di uno scale-up dei processi produttivi prima della scala reale.

La conduzione di esperienze batch su SPCSTR ha dato la possibilità di verificare il funzionamento del nuovo tipo d'impianto e di confrontarne rese e produttività con quanto osservato in vial da 116mL sia con biomassa sospesa che con biomassa adesa.

Purtroppo manca un'analisi dettagliata del costo di produzione dell'idrogeno ottenuto sfruttando la dark fermentation con questo sistema reattoristico. Ad ogni modo le economie di scala spesso aiutano rendendo più economici processi su scala reale rispetto agli stessi ma su scala di laboratorio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hallenbeck, P.C. and D. Ghosh, *Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?* Trends Biotechnol, 2009. **27**(5): p. 287-97.
2. Hallenbeck, P.C., *Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis.* International Journal of Hydrogen Energy, 2009. **34**: p. 7379-7389.
3. Bianchi, M., F. Melino, and A. Peretto, *Sistemi energetici 2 – Complementi.* 2008: Pitagora Editrice Bologna.
4. ONR, *Rapporto Rifiuti.* 2004.
5. Piccinini, S. in *Greenenergy Expo.* 2009.
6. EUROSTAT. 2010; Available from: [www.CLAL.it](http://www.CLAL.it).
7. Adam, A.C., M. Rubio-Texeira, and J. Polaina, *Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective.* Crit Rev Food Sci Nutr, 2004. **44**(7-8): p. 553-7.
8. Solaiman, D.K., et al., *Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates).* Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **71**(6): p. 783-9.
9. Guimaraes, P.M., J.A. Teixeira, and L. Domingues, *Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey.* Biotechnol Adv, 2010. **28**(3): p. 375-84.
10. FAO. 2010; Available from: <http://faostat.fao.org/>.
11. Aceves-Lara, C.A., et al., *A pseudo-stoichiometric dynamic model of anaerobic hydrogen production from molasses.* Water Res, 2008. **42**(10-11): p. 2539-50.
12. Liu, C.Z., F. Wang, and F. Ou-Yang, *Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized Saccharomyces cerevisiae in magnetic particles.* Bioresour Technol, 2009. **100**(2): p. 878-82.
13. Levin, D.B., L. Pitt, and M. Love, *Biohydrogen production:prospects and limitations to practical application.* International Journal of Hydrogen Energy, 2004. **29**: p. 173-185.
14. Ghirardi, M.L., et al., *Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>.* Trends Biotechnol, 2000. **18**(12): p. 506-11.
15. Kosourov, S., et al., *Sustained hydrogen photoproduction by Chlamydomonas reinhardtii: Effects of culture parameters.* Biotechnol Bioeng, 2002. **78**(7): p. 731-40.

16. Melis, A., et al., *Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol, 2000. **122**(1): p. 127-36.
17. Thauer, R.K., K. Jungermann, and K. Decker, *Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria*. Bacteriol Rev, 1977. **41**(1): p. 100-80.
18. Verhaart, M.R., et al., *Hydrogen production by hyperthermophilic and extremely thermophilic bacteria and archaea: mechanisms for reductant disposal*. Environ Technol, 2010. **31**(8-9): p. 993-1003.
19. Wang, J. and W. Wan, *Factors influencing fermentative hydrogen production: A review*. International Journal of Hydrogen Energy, 2009. **34**: p. 799-811.
20. Beguin, P. and M. Lemaire, *The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1996. **31**(3): p. 201-36.
21. Chou, C.J., et al., *Hydrogenesis in hyperthermophilic microorganisms: implications for biofuels*. Metab Eng, 2008. **10**(6): p. 394-404.
22. Brenner, K., L. You, and F.H. Arnold, *Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology*. Trends Biotechnol, 2008. **26**(9): p. 483-9.
23. Akhtar, M.K. and P.R. Jones, *Engineering of a synthetic hydF-hydE-hydG-hydA operon for biohydrogen production*. Anal Biochem, 2008. **373**(1): p. 170-2.
24. Veit, A., et al., *Constructing and testing the thermodynamic limits of synthetic NAD(P)H:H(2) pathways*. Microb Biotechnol, 2008. **1**(5): p. 382-94.
25. Ueno, Y., H. Fukui, and M. Goto, *Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste*. Environ Sci Technol, 2007. **41**(4): p. 1413-9.
26. Jenney, F.E., Jr. and M.W. Adams, *Hydrogenases of the model hyperthermophiles*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1125**: p. 252-66.
27. Vignais, P.M. and B. Billoud, *Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview*. Chem Rev, 2007. **107**(10): p. 4206-72.
28. Casalot, L. and M. Rousset, *Maturation of the [NiFe] hydrogenases*. Trends Microbiol, 2001. **9**(5): p. 228-37.
29. Meyer, J., *[FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(9): p. 1063-84.

30. Shima, S. and R.K. Thauer, *A third type of hydrogenase catalyzing H<sub>2</sub> activation*. Chem Rec, 2007. **7**(1): p. 37-46.
31. Volbeda, A., et al., *Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from Desulfovibrio gigas*. Nature, 1995. **373**(6515): p. 580-7.
32. Volbeda, A., J.C. Fontecilla-Camps, and M. Frey, *Novel metal sites in protein structures*. Curr Opin Struct Biol, 1996. **6**(6): p. 804-12.
33. Peters, J.W., et al., *X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from Clostridium pasteurianum to 1.8 angstrom resolution*. Science, 1998. **282**(5395): p. 1853-8.
34. Vanfossen, A.L., et al., *Polysaccharide degradation and synthesis by extremely thermophilic anaerobes*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1125**: p. 322-37.
35. Van Ooteghem, S.A., et al., *H<sub>2</sub> production and carbon utilization by Thermotoga neapolitana under anaerobic and microaerobic growth conditions*. Biotechnol Lett, 2004. **26**(15): p. 1223-32.
36. Deguchi, S., K. Tsujii, and K. Horikoshi, *Cooking cellulose in hot and compressed water*. Chem Commun (Camb), 2006(31): p. 3293-5.
37. Yu, J.S., et al., *Liposome-mediated DNA uptake and transient expression in Thermotoga*. Extremophiles, 2001. **5**(1): p. 53-60.
38. Jiang, Y., et al., *A highly efficient method for liquid and solid cultivation of the anaerobic hyperthermophilic eubacterium Thermotoga maritima*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **259**(2): p. 254-9.
39. Tsudome, M., et al., *Versatile solidified nanofibrous cellulose-containing media for growth of extremophiles*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(13): p. 4616-9.
40. Boiangiu, C.D., et al., *Sodium ion pumps and hydrogen production in glutamate fermenting anaerobic bacteria*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2005. **10**(2-4): p. 105-19.
41. Schut, G.J. and M.W. Adams, *The iron-hydrogenase of Thermotoga maritima utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production*. J Bacteriol, 2009. **191**(13): p. 4451-7.
42. Stetter, K.O., *History of discovery of the first hyperthermophiles*. Extremophiles, 2006. **10**(5): p. 357-62.
43. Vanfossen, A.L., et al., *Carbohydrate utilization patterns for the extremely thermophilic bacterium Caldicellulosiruptor saccharolyticus reveal broad growth substrate preferences*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(24): p. 7718-24.

44. Rainey, F.A., et al., *Description of Caldicellulosiruptor saccharolyticus gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium*. FEMS Microbiol Lett, 1994. **120**(3): p. 263-6.
45. Kadar, Z., et al., *Yields from glucose, xylose, and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Appl Biochem Biotechnol, 2004. **113-116**: p. 497-508.
46. van de Werken, H.J., et al., *Hydrogenomics of the extremely thermophilic bacterium Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(21): p. 6720-9.
47. de Vrije, T., et al., *Glycolytic pathway and hydrogen yield studies of the extreme thermophile Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **74**(6): p. 1358-67.
48. de Vrije, T., et al., *Efficient hydrogen production from the lignocellulosic energy crop Miscanthus by the extreme thermophilic bacteria Caldicellulosiruptor saccharolyticus and Thermotoga neapolitana*. Biotechnol Biofuels, 2009. **2**(1): p. 12.
49. van Niel, E.W., P.A. Claassen, and A.J. Stams, *Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Biotechnol Bioeng, 2003. **81**(3): p. 255-62.
50. Verhees, C.H., et al., *The unique features of glycolytic pathways in Archaea*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 2): p. 231-46.
51. Silva, P.J., et al., *Enzymes of hydrogen metabolism in Pyrococcus furiosus*. Eur J Biochem, 2000. **267**(22): p. 6541-51.
52. Sapra, R., K. Bagramyan, and M.W. Adams, *A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7545-50.
53. Woodward, J., et al., *In vitro hydrogen production by glucose dehydrogenase and hydrogenase*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(7): p. 872-4.
54. Woodward, J., et al., *Enzymatic production of biohydrogen*. Nature, 2000. **405**(6790): p. 1014-5.
55. Ye, X., et al., *Spontaneous high-yield production of hydrogen from cellulosic materials and water catalyzed by enzyme cocktails*. ChemSusChem, 2009. **2**(2): p. 149-52.
56. Takahata, Y., et al., *Thermotoga petrophila sp. nov. and Thermotoga naphthophila sp. nov., two hyperthermophilic bacteria from the Kubiki oil reservoir in Niigata, Japan*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 5): p. 1901-9.

57. Connors, S.B., et al., *Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic Thermotoga species*. FEMS Microbiol Rev, 2006. **30**(6): p. 872-905.
58. Worning, P., et al., *Structural analysis of DNA sequence: evidence for lateral gene transfer in Thermotoga maritima*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(3): p. 706-9.
59. Zhaxybayeva, O., et al., *On the chimeric nature, thermophilic origin, and phylogenetic placement of the Thermotogales*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(14): p. 5865-70.
60. Lee, D., et al., *WeGAS: a web-based microbial genome annotation system*. Biosci Biotechnol Biochem, 2009. **73**(1): p. 213-6.
61. Nelson, K.E., et al., *Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of Thermotoga maritima*. Nature, 1999. **399**(6734): p. 323-9.
62. d'Ippolito, G., et al., *Hydrogen metabolism in extreme thermophile Thermotoga Neapolitana*. International Journal of Hydrogen Energy, 2010. **35**: p. 2290-2295.
63. Wrba, A., et al., *Lactate dehydrogenase from the extreme thermophile Thermotoga maritima*. Eur J Biochem, 1990. **188**(1): p. 195-201.
64. Eriksen, N.T., T.M. Nielsen, and N. Iversen, *Hydrogen production in anaerobic and microaerobic Thermotoga neapolitana*. Biotechnol Lett, 2008. **30**(1): p. 103-9.
65. Vargas, M. and K.M. Noll, *Catabolite repression in the hyperthermophilic bacterium Thermotoga neapolitana is independent of cAMP*. Microbiology, 1996. **142 ( Pt 1)**: p. 139-44.
66. Kadar, Z., et al., *Hydrogen production from paper sludge hydrolysate*. Appl Biochem Biotechnol, 2003. **105 -108**: p. 557-66.
67. Eriksen, N.T., et al., *H<sub>2</sub> synthesis from pentoses and biomass in Thermotoga spp.* Biotechnol Lett, 2011. **33**(2): p. 293-300.
68. Munro, S.A., S.H. Zinder, and L.P. Walker, *The fermentation stoichiometry of Thermotoga neapolitana and influence of temperature, oxygen, and pH on hydrogen production*. Biotechnol Prog, 2009. **25**(4): p. 1035-42.
69. Van Ooteghem, S.A., S.K. Beer, and P.C. Yue, *Hydrogen production by the thermophilic bacterium Thermotoga neapolitana*. Appl Biochem Biotechnol, 2002. **98-100**: p. 177-89.
70. Nguyen, D., et al., *Hydrogen production by the hyperthermophilic eubacterium, Thermotoga neapolitana, using cellulose pretreated by ionic liquid*. International Journal of Hydrogen Energy, 2008. **33**: p. 5161-5168.



71. Nguyen, T.A., et al., *Hydrogen production of the hyperthermophilic eubacterium, Thermotoga neapolitana under N<sub>2</sub> sparging condition*. Bioresour Technol, 2010. **101 Suppl 1**: p. S38-41.
72. Childers, S.E., M. Vargas, and K.M. Noll, *Improved Methods for Cultivation of the Extremely Thermophilic Bacterium Thermotoga neapolitana*. Appl Environ Microbiol, 1992. **58**(12): p. 3949-53.

## **APPENDICE**

### **Periodo di dottorato all'estero presso il Wageningen UR (NL)**

## HyTIME Project

Hydrogen is the most abundant element in the universe, it simply changes state from water to hydrogen and, during consumption, back to water. The pollutants emitted by fossil energy systems (e.g. CO, CO<sub>2</sub>, CnHm, SO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub>, radioactivity, heavy metals, ashes, etc.) are greater and more damaging than those that might be produced by a renewable hydrogen energy system. Worldwide reduction of CO<sub>2</sub> emission to reduce the risk of climate change (greenhouse effect) requires a major restructuring of the energy system. More than this the use of hydrogen as an energy carrier is a long-term option to reduce CO<sub>2</sub> emissions. Energy, economic and political crises as well as the health of humans, animals and plant life are all critical concerns. There is an urgent need to expedite the process of implementing the hydrogen economy. A worldwide conversion from fossil fuels to hydrogen would eliminate many problems and their ramifications. The optimal endpoint for conversion to the hydrogen economy is the substitution of clean hydrogen for the present fossil fuels. The production of hydrogen from non-polluting sources (such as different kinds of biomasses and wastes) is the ideal way (Zweig RM., 1992). These are the reasons why Bioconversion Group of Wageningen UR Food & Biobased Research is investigating new technologies for the biohydrogen production since more than ten years proposing numerous projects.

HyTIME is the new European project where nine partners including universities, knowledge centres and industry will examine ways to increase the hydrogen production rate during the next three years. The core output of the project is the operation of a continuous fermentation process for the production of 1-10 kg hydrogen/day. In this project, the residual biomass from the production of hydrogen by fermentation will be utilised to produce biogas via anaerobic digestion. The bio-methane can also be used as biofuel e.g. in cogeneration plants for thermal and electric energy production and/or in transport. The aim of HyTIME is to show the possibility of full-scale application of this technology through the optimization of all the process parameters and the choice of the most efficient technologies currently available. Hydrogen is regarded as the future fuel as its conversion to power is highly efficient. Some bacteria can produce hydrogen from organic materials (such as grass, straw, and also fruit and vegetables no longer suitable for sale) growing in specific environmental conditions. The so-called thermophilic bacteria fermenting biomass at a temperature of 70°C and in absence of oxygen are the most productive. This has been proven in previous hydrogen projects: Biohydrogen, EET-BioH<sub>2</sub> and HYVOLUTION. Pieter Claassen, researcher at Food & Biobased Research who led these previous hydrogen projects, is coordinating HyTIME. Project partners are Heijmans Techniek & Mobiliteit B.V. and HyGear B.V. (The Netherlands), Awite Bioenergie GmbH and RWTH Aachen University (Germany), Environment Park SPA (Italy), Vienna University of Technology (Austria), Wiedemann-Polska Projekt (Poland) and Veolia Environment Recherche & Innovation (France).

Continuous fermentative H<sub>2</sub> processes can be mainly divided in two categories: suspended systems and immobilized systems (Oh et al. 2004). Suspended systems allow better mass transfer between microorganisms and substrate but have problems in maintaining a constant

amount of H<sub>2</sub>-producing bacteria inside the reactor under low high dilution rates (Chen et al., 2008). On the other hand immobilized based systems are more able to maintain higher biomass concentration under high dilution rates without biomass washout (Zhang et al., 2008). Till today, immobilized-cell systems include surface attachment (Oh et al., 2004), self-flocculation (Kim et al., 2005), gel entrapment (Wu et al. 2006) and granulation (Thomas A. Kotsopoulos et al., 2005) approaches. These techniques have been tested to produce H<sub>2</sub> in a wide variety of bioreactors such as fixed-bed reactors (Lee et al., 2003), granular-sludge bed reactors (Lee et al., 2004), up-flow anaerobic sludge blanket reactor (Thong et al., 2008 and Kotsopoulos et al., 2005) and fluidized bed reactors (Lin and Cheng, 2006). The researchers at Food & Biobased Research chose to use supports (solid carriers) to offer more surface for the biofilm formation. In fact bacteria show the ability to form a thin layer of biofilm that is maintained attached on the support's surface. This allows to have smaller reactors with an high surface area, which will turn into lower investment costs maintaining the degradation of the same organic load. The kind of reactor that the group wants test is innovative and It is called Combined Moving Trickling Bed Reactor.

To reach the objectives of HyTime project a lot of experiments are needed and the work here presented is a short part of the planned activities. So here are showed: First of all the main important thermophile bacteria selected in previous works by Bioconversion research group are described; Secondly some test to evaluate the ability of these bacteria to produce biofilm on different supports (carriers) are reported; moreover the new Combined Movement Trickling Bed (CMTB) bioreactor is presented and tested.

## MATERIALS & METHODS

### Tested *Caldicellulosiruptor* strains

*Caldicellulosiruptor saccharolyticus* is a non-spore forming Gram-negative bacterium. It was isolated from New Zealand thermal springs (F.A. Rainey *et al.*, 1994). Cells are straight rods. Growth not obtained after heat treatment at 115°C for 20 min. Growth strictly anaerobic, occurring over the temperature range 45-80°C with an optimum of 70°C. The pH range for growth was 5.5 to 8.0, the optimum pH for growth being 7.0. Monosaccharides, disaccharides and polysaccharides serve as fermentable substrates, like arabinose, amorphous cellulose, avicell, cellobiose, fructose, galactose, glucose, glycogen, gum guar, gum locust bean, lactose, laminarin, lichenin, mannose, maltose, pullulan, pectin, rhamnose, Sigmacell 20, Sigmacell 50, Sigmacell 100, starch, sucrose, xylan, and xylose. The main fermentation end products on sugars are acetate and lactate, trace amounts of ethanol are also detected and hydrogen sulfide is not produced (F.A. Rainey *et al.* 1994). The extreme thermophilic bacterium *C. saccharolyticus* can produce hydrogen at yields close to the theoretical maximum of the dark fermentation process (i.e., 4 mol H<sub>2</sub>/mol hexose) according to the Embden–Meyerhof pathway (T. de Vrije *et al.*, 2007).

*Caldicellulosiruptor owensensis* is an anaerobic, extremely thermophilic, xylanolytic, non-spore-forming bacterium. It was isolated from a sediment sample taken from Owens Lake, California. This strain shows a Gram negative reaction and occurred as short rods which sometimes formed long chains containing a few coccoid cells. It grew at 50-80°C, with an optimum at 75°C. The pH range for growth was 5.5-9.00 with an optimum at about pH 7.5 (Chi-Yu Huang *et al.*, 1998). This strain could grow on a wide variety of carbon sources including arabinose, cellulose, cellobiose, dextrin, fructose, galactose, glucose, glycogen, inositol, lactose, mannitol, mannose, maltose, pectin, raffinose, rhamnose, ribose, starch, sucrose, tagatose, xylan and xylose but not acetate, arbutin, trypticase peptone, erythritol, glycerol, lactate, melibiose, methanol, pyruvate, sorbitol and trehalose (Chi-Yu Huang *et al.*, 1998). The end products are acetic and lactic acid, ethanol, and a biogas composed by H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. Like *C. saccharolyticus* also *C. owensensis* can produce hydrogen at yields close to the theoretical maximum of the dark fermentation process (i.e., 4 mol H<sub>2</sub>/mol hexose) according to the Embden–Meyerhof pathway.

*Caldicellulosiruptor kristijanssonii* is a strictly anaerobic, non-spore forming bacteria isolated from a biomat sample of an Icelandic, slightly alkaline, hot spring. *C. kristijanssonii* is rod-shaped, non-spore-forming, non-motile and stained Gram-negative at all stages of growth. It grew at 45-82°C, with an optimum growth temperature around 78°C. At 70°C, growth occurred at pH 5.8-8.0, with an optimum near pH 7.0. (Sylvia Bredholt *et al.*, 1999). Grew on Avicel, cellobiose, dextrin, D-fructose, D-galactose, D-glucose, lactose, maltose, mannose, pectin, salicin, soluble starch, sucrose, trehalose, xylan and xylose (Sylvia Bredholt *et al.*,

1999). The main fermentation products are acetic and lactic acid. In addition to the organic acids, the strain produced  $H_2$  and  $CO_2$  on all the different substrates tested (Sylvia Bredholt *et al.*, 1999).

## Tested Supports



Figure 1

The **Bioflow 9 - (PE)** (RVT Process Equipment GmbH, Germany) is in polyethylene (PE) and with its filigree structure shows a very high specific surface area of  $800 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . and is mostly used for waste water treatment with low organic load. An example of this is the waste water of fish farming.



Figure 2

**VitraPOR® - (PGB)** Borosilicate Glass 3.3 (ROBU Glasfilter-Geräte GmbH, Germany) is a carrier for cell cultivation. Manufactured to form 4mm diameter beads with a constant pore size about 40–100 micrometers. VitraPOR® has inner surfaces of up to  $1.75 \text{ m}^2/\text{gr.}$  and a pore volume of up to 50%. The pore size of our stock was  $60 \mu\text{m}$ .

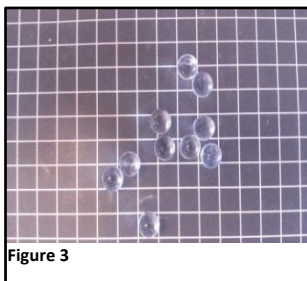


Figure 3

**Glass Beads 5mm - (GB)** are little spheres made of glass often used like distillation column packing, mixing beads and boiling stones. In fact glass is a transparent and hard material with excellent resistance to high temperature. These kinds of beads are not porous.



Figure 4

**Miscanthus - (MISC)** is a genus of about 15 species of perennial grasses native to subtropical and tropical regions of Africa and southern Asia, with one species (*M. sinensis*) extending north into temperate eastern Asia. Stems were harvested and chopped to a length of 0.5–5 cm. The dry weight of the harvested material varied between 86% and 90%. The samples were stored, protected from the weather under dry conditions (T. de Vrije *et al.*, 2002).

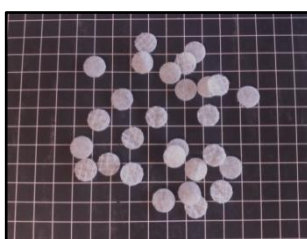


Figure 5

Fibra-Cel® disks - (FCD), (New Brunswick Scientific, USA) are a proven support system used in suspension and anchorage-dependent cultures. Their surface area is about  $1.2 \text{ m}^2/\text{g}$ . They can be used in bioreactors and are also available for use in disposable bags, shake flasks and other bioreactor systems. Fibra-Cel® disks are treated

electrostatically to facilitate suspension cells adhering to the disks and became trapped in the fibre system where they remain throughout the process. These disks are predominately used as a matrix for growth of cells when the desirable product is not the biomass but other products secreted by the biomass during the process.



Figure 6

Zeolites – (ZEO) are aluminasilicate members of the family of micro porous solids known as “molecular sieves”. This term refers to a particular property of this material due to a very regular pore structure of molecular dimensions. Used in a wide variety of applications and also as commercial adsorbents. The surface area of zeolites is around  $0.18 - 0.27 \text{ dm}^2/\text{g}$ . (Xiaoming Du, Erdong Wu, 2007).



Figure 7

Activated carbon – (AC) (SIGMA-ALDRICH, Fluka), also called activated charcoal or activated coal is a form of carbon, processed to be full of small and low-volume pores that increase the surface area available for adsorption or chemical reactions. Surface area about  $500 \text{ m}^2/\text{g}$ . Based on this AC is often used

as filter in food processes like decolouring and during waste water treatments.

## Inoculum for uBatch test with supports

*C. saccharolyticus* DSM 8903, *C. owensensis* DSM 13100 and *C. saccharoliticum* DSM 8903 were purchased from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germany). The growth medium contained per liter: 0.3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.3 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.5 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml SL-10 trace element solution ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)), 0.5 mg resazurin, 0.4 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.75 g cysteine-HCl, 4 g glucose, 0.9 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 g YE (Duchefa, The Netherlands), and 50mM MOPS 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (pH 7.0). For sterilization the medium was autoclaved for 20 min at  $121^\circ\text{C}$ . The solutions of glucose, yeast extract, MOPS,  $\text{MgCl}_2$ , KOH and cysteine were sterilized separately through pressure filtration (cut-off  $0.2 \mu\text{m}$ ). The fermentation was started by inoculating with 10% of a pre-culture into glucose media. Starting from cryovial the first culture was grown over weekend at  $70^\circ\text{C}$ . After that 10% of the volume was transferred in fresh medium and grown overnight before to be used as inoculum. Final medium volume in each 116mL flasks was about 20mL.



## CMTB Reactor

This new bioreactor has the aim to keep inside the biomass using supports. Moreover It also takes the advantage of the medium's trickling in the gas-disengager cylinder. In fact has been described that the trickling of the medium enhances the passage of  $H_2$  from liquid to gas phase (F.O. Obazu *et al.*, 2012). Another important aspect is that this reactor doesn't use impellers, mixing is done only using the recirculation pump. The bioreactor body was made in glass (Utrecht University Glass Workshop), lids were in stainless steel and all the condensers and connections were components from Applikon (NL). The temperature, set at  $71^\circ\text{C}$ , was maintained using a water jacket connected to a heating bath. Fig. 8 shows a similar system used by V.M. Gray group, School of Molecular and Cell Biology, University of the Witwatersrand, South Africa, for self-granulation experiments at high temperatures (L. Ngoma *et al.*, 2011). Like South Africa's reactor our system consists of two main tubular components connected together by both the recycling (n°14 Fig. 8) and effluent connecting pipe (n°10 Fig. 8). The left tubular reactor consists of three main parts: bottom (Inlet n°1 Fig 9), middle (n° 7 Fig. 8) and top (effluent decanter n°9 Fig. 8). The bottom part was provided with a  $N_2$  sparger and filled with 225g of Floating balls (made in PE) to reach the right liquid working volume about 5.5L. The middle part was filled with selected supports (900g of Bioflow 9 PE). Two stainless-steel sieves divided the tubular reactor parts and keeping separate Floating balls and Bioflow 9 and preventing the loss of supports from the bioreactor. The right cylinder, called gas-disengager, was completely empty. The feeding of fresh medium was done using a Masterflax L/S pump with Easy-load®, tube n°14, flow of 4mL/min. The same pump with a second pump head were used for wastes' way out using tube n°16. During the feeding the overflow from the reactor was decanted into the effluent connecting pipe and dropped in the gas-disengager cylinder. The recirculation pump, Masterflex L/S with easy-load® II and Masterflex, tube n°36, flow 360mL/min, took the effluent discharged from the bioreactor and passed through a gas-disengager cylinder and pump It back into the bioreactor.

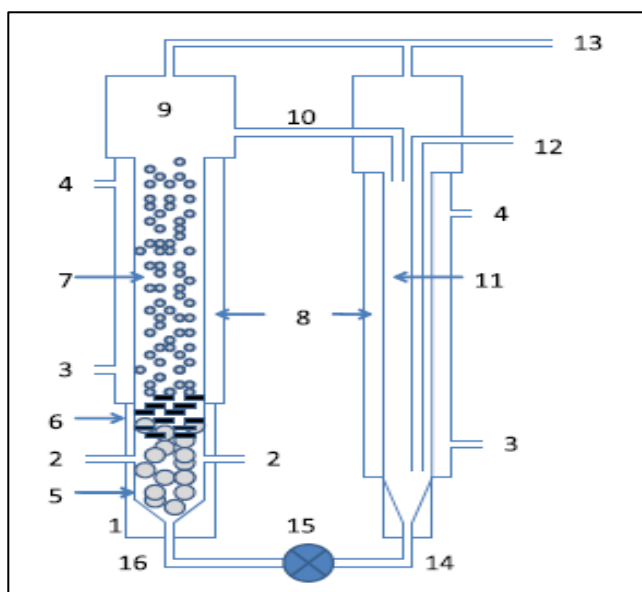


Figure 8: Bioreactor system. 1 - inlet; 2 - influent inlets; 3 - water jacket inlet; 4 - water jacket outlet; 5,7 - supports; 8 - water jacket; 9 effluent decanter; 10 - effluent connecting pipe to gas disengager; 11 - gas-disengager tube; 12 - effluent outlet overflow pipe; 13 - gas flow pipe; 14 - effluent recycling pipe; 15 - effluent recycling pump; 16 - effluent recycling inlet. (L. Ngoma *et al.*, 2011)



The nitrogen flow in has been designed and controlled using a Mass Flow Controller with digital interface. The amount of biogas produced was measured using a gas flow meter (Ritter TG05/6). After that there was a gas sampling port for not on-line GC analysis. Temperature and pH were continuously measured using electrodes connected to a controller (ADI 1030, Applikon) that was connected to a base pump for the pH control. In the middle part of the reactor there was one liquid sampling ports. No solid sampling port was designed. Sampling ports were done in both feeding and wastes tank to evaluate Glucose In and Glucose Out during stable states. The WUR's CMTB reactor was completely built and set by me personally and Patrick van Doevert during my period at WUR.

## Inoculum for CMTB Reactor

According to previous works (Silvia Noebauer and Wolfgang Schnitzhofer) a co-culture inoculum (10% of CMTB total liquid volume) of *C. saccharolyticus* and *C. owensensis* was prepared. To achieve *C. saccharolyticus* and *C. owensensis* were grown separately at 70°C in 750mL CSTR batch culture using the same medium above reported. An inoculum of both cultures was transferred in the ration *C. saccharolyticus*/*C. owensensis* = 1/2 in the CMTB reactor.

## ANALYTICAL METHODS

The H<sub>2</sub> concentration in the gas phase of the 120mL flasks was measured by GC using a RVS MolSieve 5A, 60/80 mesh, 3m x 1/8" column. The temperature of TCD detector, injector and column was 100°C, 80°C, 50°C respectively. Sparger gas was N<sub>2</sub>. H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> production in bioreactors were monitored manually at regular intervals on a CP 4900 micro GC equipped with a thermal conductivity detector (Varian, The Netherlands). Hydrogen was measured on a MolSieve MSAHIBF module, the temperatures of the injector and column were 60 and 80°C, respectively. CO<sub>2</sub> was monitored using a Pora Plot Q, PPQHIBF module, and the temperature of the injector and column were both 80°C. Concentrations of residual sugars and fermentation products were evaluated by HPLC using a Shodex ionpak KC811 column (Waters, The Netherlands) at 80°C, with 3 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the mobile phase (1 ml/min) on RI detector. The samples were 1:1 diluted in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with 250 mM propionic acid, as the internal standard, and filtered through a 0.45-µm filter prior to injection. The optical density (OD) of the cultures was determined for each liquid sample against water at 580 nm. The cell dry weight (CDW) of the co-culture was estimated from the OD<sub>580</sub> using the relation  $CDW (g/L) = 0.377 \times OD_{580} + 0.011$  for *C. saccharolyticus* (T. de Vrije *et al.*, 2007). Carbon balance was based on the molar ratio CH<sub>1.62</sub>O<sub>0.46</sub>N<sub>0.23</sub>S<sub>0.0052</sub>P<sub>0.0071</sub> which corresponds to a molecular weight of 24.6 g/mol (T. de Vrije *et al.*, 2007) and CO<sub>2</sub> production was considered an half of the produced H<sub>2</sub>. Attached biomass was evaluate only at the end of the experiment, supports were put in oven connected to a vacuum pump at 60°C for 8 hours, attached biomass in the reactor was assumed stable and continuously renewed during all the experiment after that

the first steady state was reached. Proteins assay has done according to micro biuret analysis (data not showed).

## EXPERIMENTAL CONDITIONS

### Attached biomass tests for *C. kristijanssonii*, *C. saccharolyticus*, and *C. owensensis* on supports

The three different strains, grown like previously described, were inoculated in 120mL serum flasks where fresh medium was put in anaerobic conditions. 20mL of total volume for each support were put in different 120mL serum flasks. Table 1 shows total volumes, related weights and real volumes for each support. The growth was followed for 3 days. During the growth the gas in headspaces, organic acids and residue sugars were analysed daily. At the end of the growth flasks and carriers were washed 3 times with physiologic salt solution and the supports were transferred in new sealed serum flasks with fresh anaerobic medium. Hydrogen production, organic acids production and OD<sub>580</sub> were monitored. All the samples were in duplicate.

Table 1: volumes and weights for each support

Support	Volume including empty spaces (mL)	Weight (g)	Real volume (mL)
<i>Bioflow 9 PE</i>	20	2,71	4
<i>Porous Glass Beads</i>	20	15,48	7
<i>Glass Beads</i>	20	27,94	11
<i>Mischantus</i>	20	1,3	4
<i>Ac Charcoal</i>	20	11,37	8
<i>Zeolite</i>	20	17,05	9
<i>Fibracell Disks</i>	20	1,69	2

### CMTB Reactor co-culture

Once selected the support and the best couple of *Caldicellulosiruptor* strains, two 1L CSTRs (Applicon NL) were set for a suspended batch culture about 750mL using 10g/L Glucose medium. The reactors F7 and F8 were inoculate with 75mL of grown *C. owensensis* and *C. saccharolyticus* respectively. After the inoculum stirring and nitrogen flushing were about 100rpm and 1L/h respectively. After few hours these settings were changed in 350prm and 7L/h respectively. After 24h, during the exponential growth phase the cultures were transferred in the CMTB reactor filled with supports. CMTB reactor was sterilized using steam (102°C for 4 hours), the 50L medium and waste tanks autoclave-sterilized. The reactor was filled with fresh anaerobic medium and kept at 70°C. A 10% inoculum composed by *C.*

*saccharolyticus* and *C. owensensis* at ratio ½ was inserted basing on the OD<sub>580</sub> of the cultures, 2.63 and 1.18 respectively after the batch grown in 1L CSTRs. After the inoculum the CMTB reactor was kept in batch mode with a recirculation rate of 680 mL/minute and nitrogen flushing about 10.14nL/h until the Glucose was completely consumed. According to HPLC analysis, system was switched to continuous mode after 24hours of batch fermentation and the Dilution Rate was maintained at 0.24L/h (23h HRT). Dilution Rate, Recirculation and Flushing were kept as described until stable state and then for 3 HRTs. After that N<sub>2</sub> flushing was changed to 1.8nL/h, a new stable state was reached than the flushing reduced again about 0.003nL/h. A comparison between Yields (mol H<sub>2</sub>/mol Glucose consumed) and Productivities (L H<sub>2</sub>/L/day) at different nitrogen flushing rates was done basing on the analytic parameters described. Yields were calculated basing on the composition and volume of gas out (*Y<sub>a</sub>*) and on acetic acid concentration in the medium (*Y<sub>b</sub>*) according to the reaction:



## RESULTS

### Attached biomass tests for *C. kristijanssonii*, *C. saccharolyticus*, and *C. owensensis* on supports

All the results showed here came from the 120mL serum flasks after the transfer of the support in fresh medium. This means that the values of H<sub>2</sub> and organic acids productions were originated by the transferred biomass attached on the supports. The first test was done comparing *C. Kristijanssonii* with all the support showed above (Fig. 9). 65 hours after the transfer in fresh medium *C. Kristijanssonii* showed no H<sub>2</sub> production on PGB, MISC and AC but 27, 41.2, 31.4, 43.2 and 20.3 mmol H<sub>2</sub>/L on PE, FIB.D, GB, ZEO and positive control respectively. Regarding the organic acids production (acetate plus lactate) on PGB and AC analysis didn't show their accumulation, on the other hand PE, MISC, FIB.D., GB, ZEO, and positive control showed 19.9, 4.2, 7, 18.3, 16.8 and 10.4 mmol Org.Acids/L respectively after 65hours. The OD<sub>580</sub> values show an high variability between different supports: 0.09, 0.341, 0.152, 0.035, 0.317, 0.731, 0.120 on PGB, PE, MISC, FIB.D., GB, ZEO, AC and positive control respectively.

The second test was done comparing *C. saccharolyticus* (Fig. 10) and *C. owensensis* (Fig. 11) only with the last support obtained: PE and PGB. This was done to complete previous tests done with these two strains on MISC, FIB.D., GB, ZEO and AC (data not showed). 64 hours after the transfer of the supports in fresh medium *C. saccharolyticus* showed an H<sub>2</sub> production about 32.2, 50.3 and 39.5 mmol H<sub>2</sub>/L on PE, PGB and positive control respectively. The organic acid production were 29.5, 26.7, 26.5 mmol Org.Acids/L on PE, PGB and positive control respectively. OD<sub>580</sub> absorbances were about 0.524, 0.195 and 0.649 for PE, PGB and positive control respectively.

Regarding *C. owensensis* the H<sub>2</sub> production, the Organic acid production and the absorbances at OD<sub>580</sub> on PE, PGB and positive control were 36.6, 46 and 34.5 mmol H<sub>2</sub>/L, 19.0, 21.8 and 22.6 mmol Org. Acids/L, 0.360, 0.153 and 0.402 respectively.

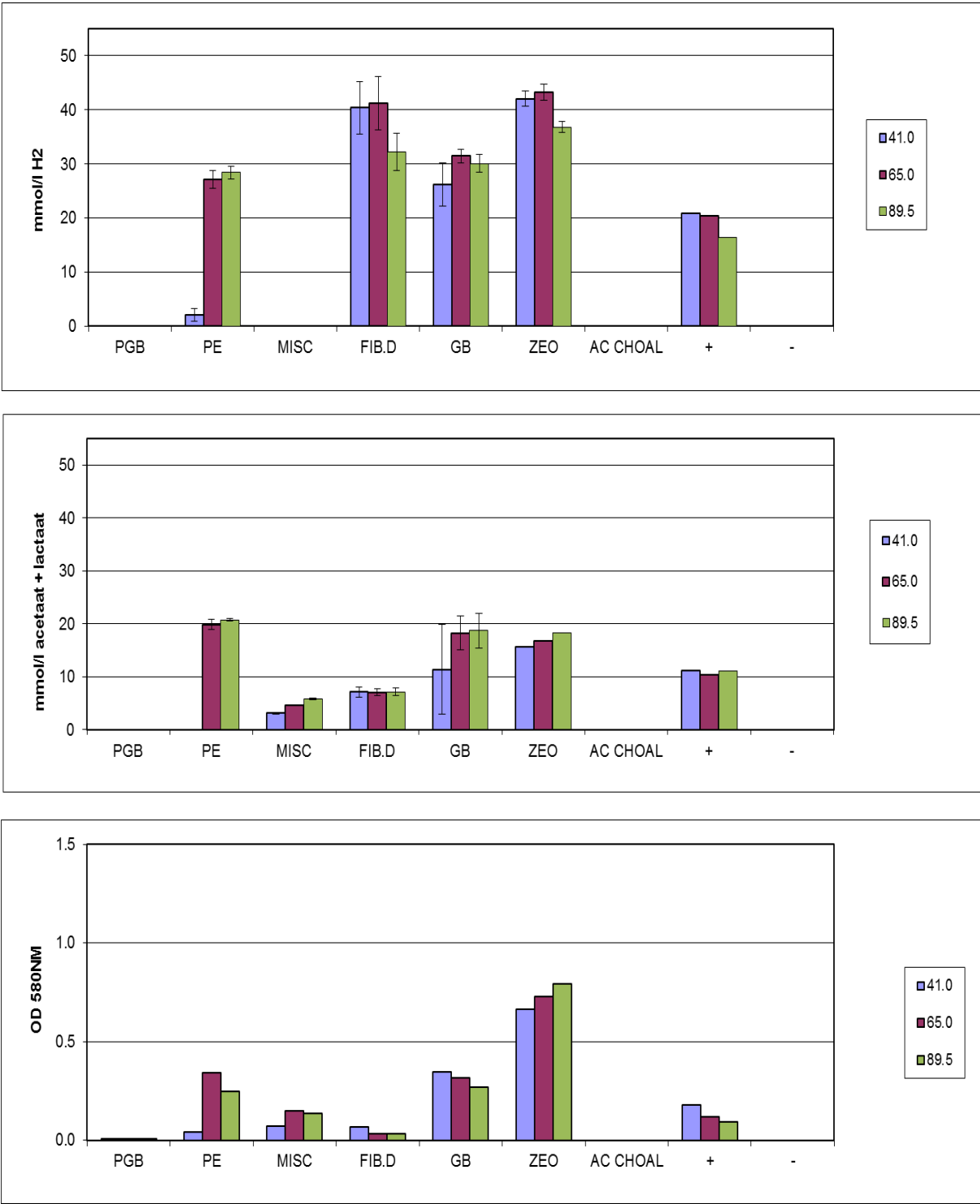


Figure 9: *C. kristijanssonii* cultures without supports (+), negative control (-) and restarted on supports PGB, PE, MISC, FIB.D, GB, ZEO, AC. First graph H<sub>2</sub> productivity, second graph organic acids productivity, third graph OD<sub>580</sub>

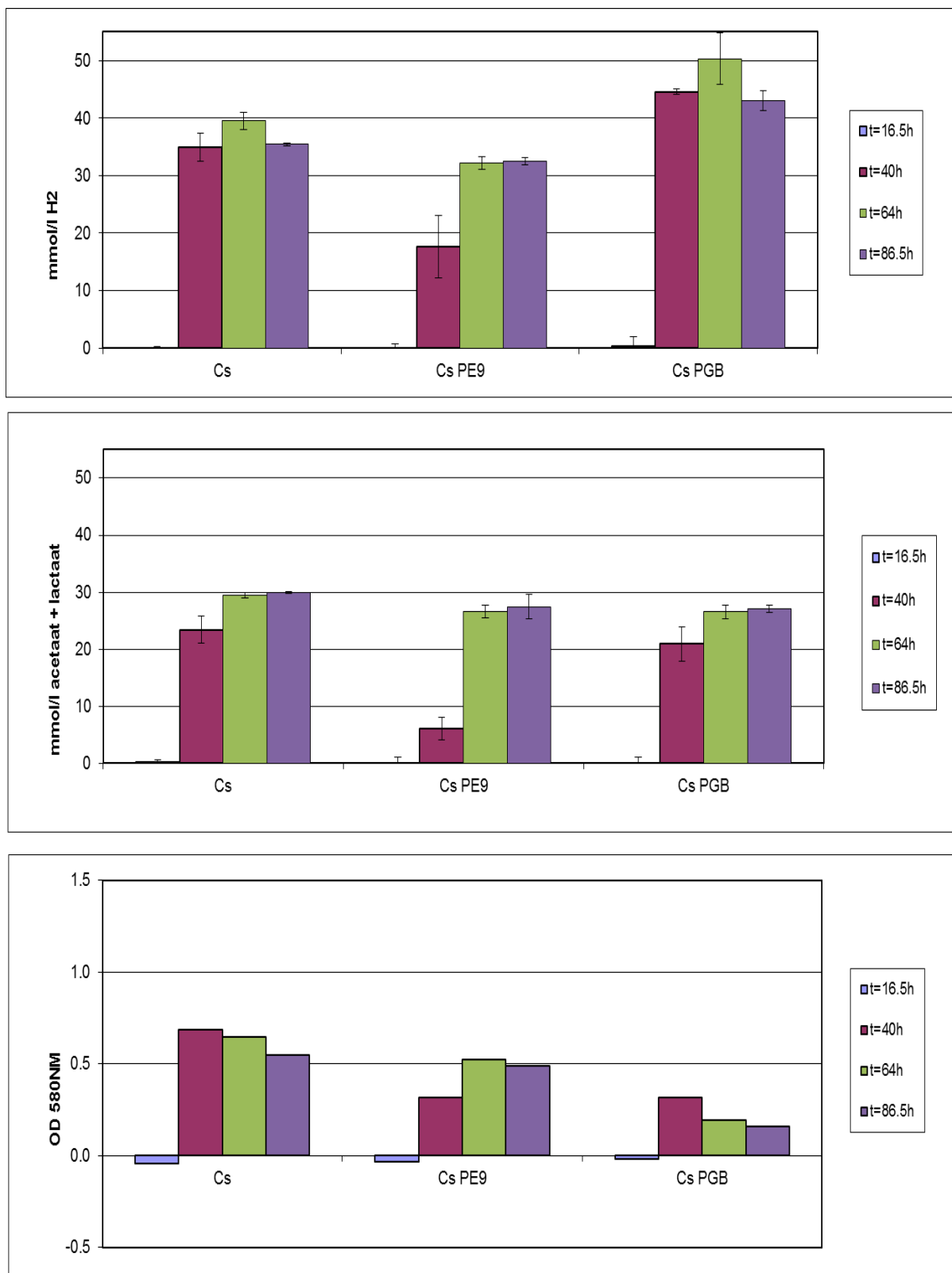


Figure 10: *C. saccharolyticus* cultures without supports (Cs), and restarted on supports PE (CsPE) and PGB (CsPGB). First graph H2 productivity, second graph organic acids productivity, third graph OD<sub>580</sub>

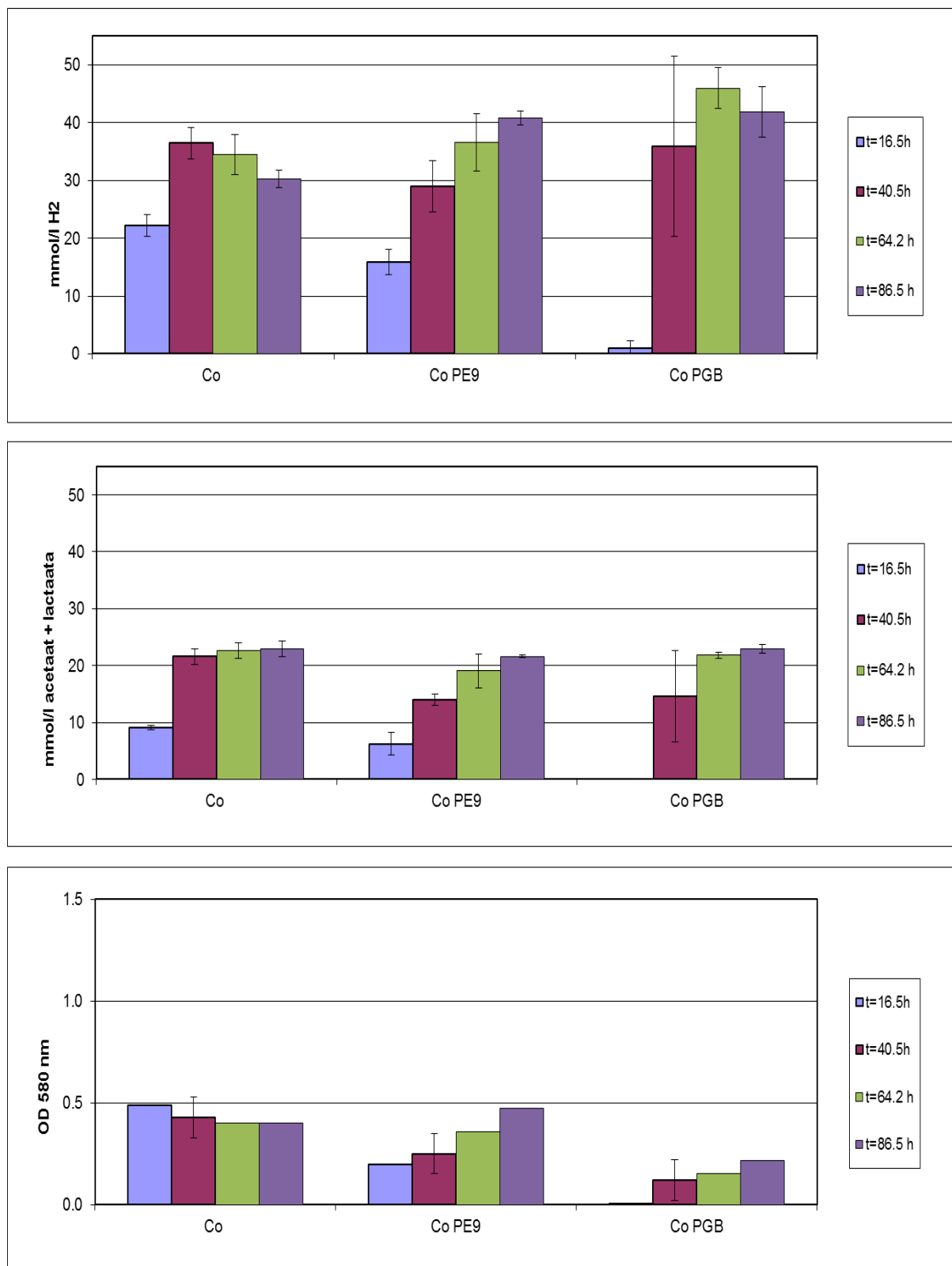


Figure 11: *C. owensis* cultures without supports (Co), and restarted on supports PE (CoPE) and PGB (CoPGB). First graph H<sub>2</sub> productivity, second graph organic acids productivity, third graph OD<sub>580</sub>

## CMTB Reactor co-culture

During the co-culture in the CMTB reactor (total time 525 hours) only the N<sub>2</sub> flushing flow was changed while all the other parameters were kept stable. The three different N<sub>2</sub> flows tested were 10.14, 1.8 and 0.003 nL/h and 3 stable states (SS1, SS2 and SS3) were reached (Fig. 12). As already announced this experiment had the aim to understand the effect of the N<sub>2</sub> flow in this kind of reactor checking the yields (mmol H<sub>2</sub> produced/mmol Glu consumed) and the productivities  $Q$  (L H<sub>2</sub>/L medium/day), (Table 2). During the SS1 at 10.14 nL N<sub>2</sub>/h  $Y_a$  and  $Y_b$  were 2.555 and 2.583 mol H<sub>2</sub>/mol Glu respectively. After that the SS2 was reached flushing the reactor at 1.8 nL N<sub>2</sub>/h  $Y_a$  and  $Y_b$  2.225 and 2.317 mol H<sub>2</sub>/mol Glu respectively. During the last stable state, SS3  $Y_a$  and  $Y_b$  were respectively 1.085 and 1.943 mol H<sub>2</sub>/mol Glu.

Table 2: Comparison between Yields from the three stable states

	N <sub>2</sub> IN (nL/h)	$Y_a$ (mol H <sub>2</sub> /mol Glu)	$Y_b$ (mol H <sub>2</sub> /mol Glu)	$\Delta Y_b - Y_a$ (mol H <sub>2</sub> /mol Glu)	$Q$ (L H <sub>2</sub> /L medium/day)
<b>SS1</b>	10.14	2.555	2.583	0.028	3.100
<b>SS2</b>	1.81	2.225	2.317	0.092	2.676
<b>SS3</b>	0.003	1.085	1.943	0.858	1.294

Around 10.14 nL/h  $Y_a$  and  $Y_b$  were very close to each other ( $\Delta = 0.028$  mol H<sub>2</sub>/mol Glu) but decreasing the nitrogen flow In the gap was increased about 0.092 and 0.858 mol H<sub>2</sub>/mol Glu using 1.81 and 0.003 nL/h N<sub>2</sub> respectively. The behaviour of  $Q$  was also related to the nitrogen flow IN and, as showed in Table 2, productivities were 3.1, 2.676 and 1.294L H<sub>2</sub>/L/day during SS1, SS2 and SS3 respectively.

At the end of the experiment the amount of attached biomass was evaluate as previously described and the total was found about 24.27 g (Table 3). Averages of suspended biomass during the three steady states SS1, SS2 and SS3 were 0.729, 0.649 and 1.787 g of dry cell/L.

Table 1: attached and suspended biomass content in the CMTB reactor

	Start Dry Weight (g)	End Dry Weight (g)	Attached Biomass (g)		Suspended Biomass (g/L)	Total Biomass (g)
<b>Bioflow 9</b>	900.00	91.3	19.3	<b>SS1</b>	0.729	28.282
<b>Floating Balls</b>	224.26	229.07	4.81	<b>SS2</b>	0.649	27.840
<b>Sieve</b>	9.88	10.04	0.16	<b>SS3</b>	1.787	34.097
		<b>Total Attached Biomass (g)</b>	24.27			

Considering that the amount of the attached biomass was stable and continuously renewed the total amount of biomass produced during SS1, SS2 and SS3 were respectively 28.282, 27.840 and 34.097 g.

Considering the moles of Acetate, Lactate, CO<sub>2</sub> and Biomass produced/mole of Glucose consumed a carbon balance was done for each steady state resulting about 85.749, 82.753 and 87,047% for SS1, SS2 and SS3 respectively.



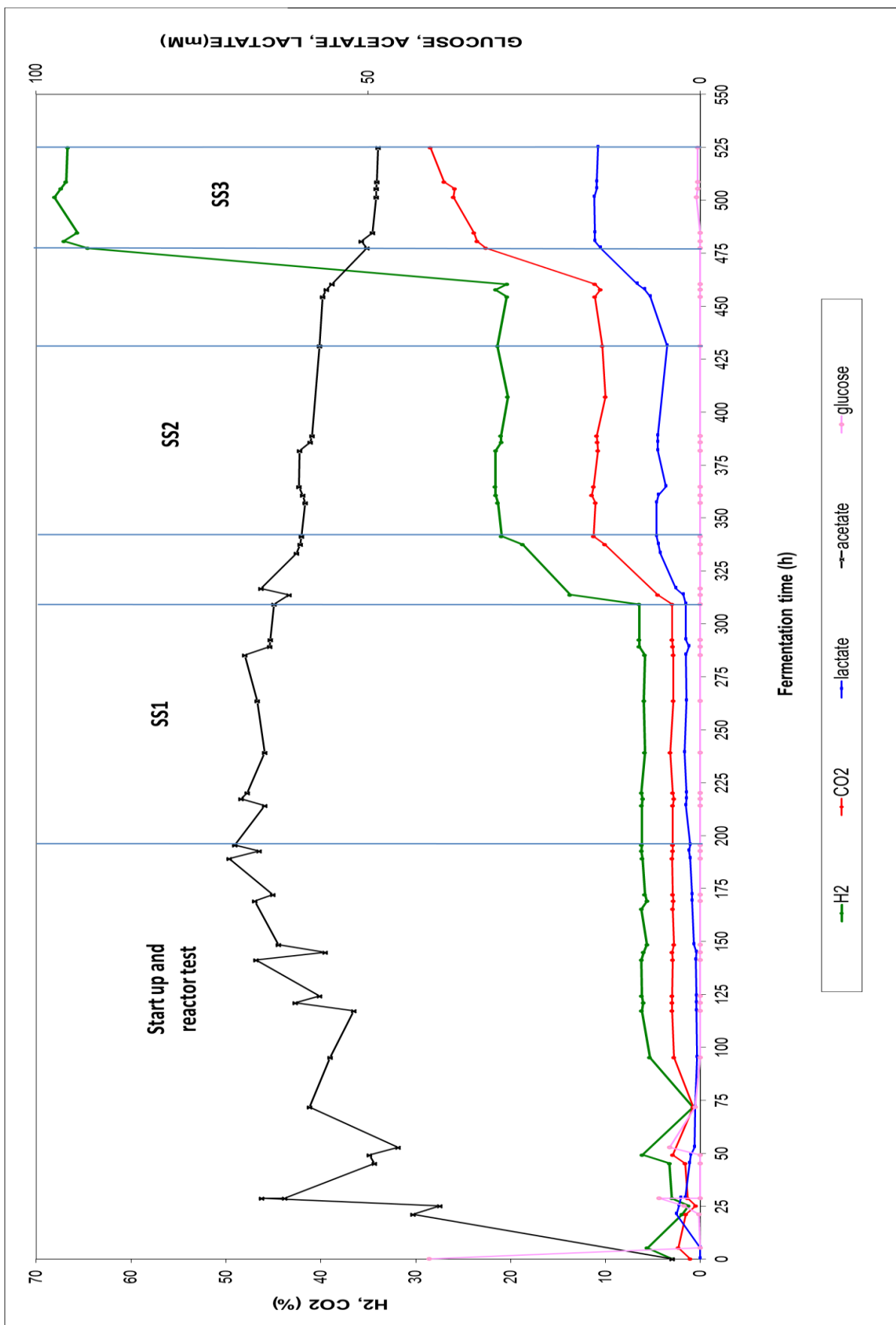


Figure 12: Gas composition and fermentation products concentration. Identification of the three steady states SS1, SS2 and SS3.

## CONCLUSIONS

The best couples of Caldicellulosiruptor bacteria and supports for the reactor experiment were chosen basing on the hydrogen production observed and the suitability of the supports tested in the uBatch experiments. Zeolite was rejected because its high OD<sub>580</sub> value were affected by Its release of dust in the medium, dust that would be also dangerous inside the reactor. On the other hand Porous Glass Beads and FiberCell Disks were rejected because of their high cost. Bioflow 9 has shown good results with all three strains tested with best results using *C. saccharolyticus* and *C. owensensis*: 32.2 and 36.6 mmol H<sub>2</sub>/L .

A new kind of reactor was set-up and tested for 525h in the hypertermophilic hydrogen production basing on a mixed culture of *C. saccharolyticus* and *C. owensensis* Bioflow 9. The evaluation of the nitrogen flow IN was evaluated and three steady states were compared on their Yields and Productivities at 10.14, 1.81 and 0.003 nL N<sub>2</sub>/h. Is possible conclude that a decrease of nitrogen flow IN cause a decrease of the Y and Q. Moreover the difference between the *Ya* and *Yb* increased and this was probably due to the not complete removal of the biogas produced during the fermentation witch, in a little ratio, remained dissolved in the liquid and was not released in the gas phase.

Basing on the Q from SS1 is possible say that this reactor, conduced as described, was able to produce 7.86g H<sub>2</sub>/h. The hydrogen Lower Heating Value is about 120 MJ/Kg and this means that the theoretical energy that the reactor was able to produce was about 0.262 kWh.

*A. Alberini*

*Thanks to:*

*T. de Vrije, M.A.W. Budde, P. van Doeveren, P.A.M. Claassen*